

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 1 月 22 日 (22.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/007713 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07H 7/06, 11/04
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/002342
- (22) 国際出願日: 2003 年 2 月 28 日 (28.02.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-208568 2002 年 7 月 17 日 (17.07.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 科学技術振興事業

団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都 千代田区 丸の内 1-5-1 Tokyo (JP).

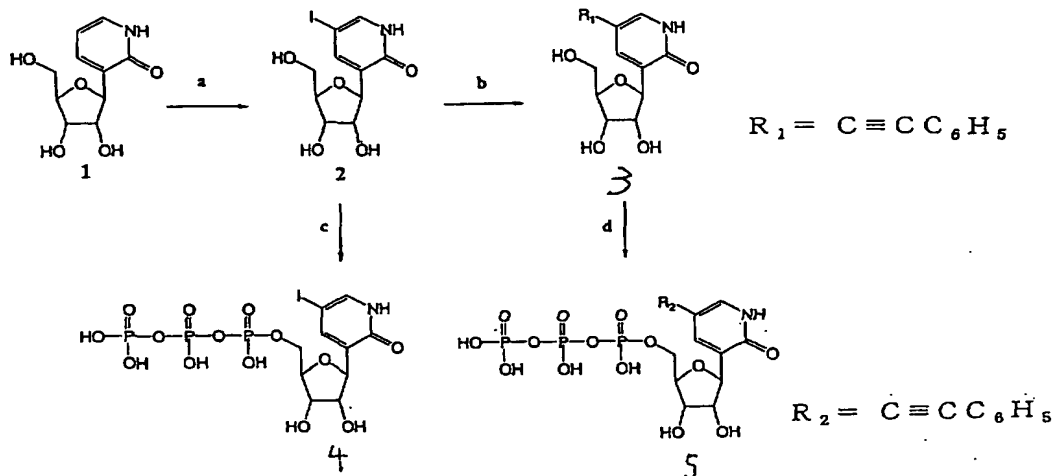
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平尾 一郎 (HIRAO, Ichiro) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 横山 茂之 (YOKOYAMA, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒230-0045 神奈川県 横浜市 鶴見区 末広町 1 丁目 7 番 2 号 理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 平尾 路子 (HIRAO, Michiko) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 三井 雅雄

[続葉有]

(54) Title: NUCLEOSIDE OR NUCLEOTIDE HAVING NOVEL UNNATURAL BASE AND UTILIZATION OF THE SAME

(54) 発明の名称: 新規な非天然型塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチド及びその利用



(a) I_2 , KCl, Na_2CO_3 , 100 °C, 4h. (b) $CF_3CONHCH_2CCH_2Pd(Ph_3P)_4$, CuI, Et_3N , DMF, rt, 4-6h. (c) (1) $POCl_3$, $(CH_3O)_3PO$, 0 °C, 2 h. (2) $(n-Bu_3NH)_2P_2O_7$, 0 °C, 10 min. (d) (1) $POCl_3$, 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene, $(CH_3O)_3PO$, 0 °C, 2 h. (2) $(n-Bu_3NH)_2P_2O_7$, 0 °C, 10 min. (3) conc. NH_4OH , rt, 10 h.

(57) Abstract: It is intended to provide a nucleoside or a nucleotide having a novel unnatural base. Namely, a nucleoside or a nucleotide having a 5-substituted-2-oxo(1H)-pyridin-3-yl group as a base. It is preferable that the base is substituted at the 5-position by a substituent selected from the group consisting of: 1) a photoreactive group selected

[続葉有]



(MITSUI, Tsuneo) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市
中央 1-3-3-5 02 Saitama (JP).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.); 〒
100-0004 東京都千代田区 大手町二丁目 2 番 1 号 新大
手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo
(JP).

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

from between iodine and bromine; 2) an alkenyl group, an alkynyl group, an amino group or a derivative thereof; 3) biotin or its derivative; and 4) a fluorescent molecule selected from among fluorescein, 6-carboxyfluorescein, tetramethyl-6-carboxyrhodamine and derivatives thereof.

(57) 要約: 本発明は、非天然型塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチドを提供することを目的とする。本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドは、5 位置換-2-オキソ (1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有する。好ましくは、前記塩基の 5 位が、以下の 1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基; 2) アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体; 3) ビオチン又はその誘導体; あるいは 4) フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、テトラメチル-6-カルボキシローダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子からなるグループから選択される置換基によって置換されている。

明細書

新規な非天然型塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチド及びその利用

5 技術分野

本発明は、新規な非天然型塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチド及びその利用に関する。

背景技術

生体高分子である核酸（DNA，RNA）は、生命活動に必要となる膨大な量の遺伝情報を、僅か4種類の塩基の組合せからなる配列として記録している。また、核酸は自分自身を鋳型としてDNAポリメラーゼにより自己複製し、さらにRNAポリメラーゼによる転写、リボソームによる翻訳というプロセスを介して、DNAからDNAへ、DNAからRNAへ、RNAからタンパク質へと遺伝情報を伝達する。この遺伝情報の複製と伝達を可能としているのは排他的な塩基対形成（A・T/U、G・C）のルールである。また、核酸は、多様な高次構造を形成して様々な機能を発揮する。例えば、*in vitro*セクション法によって、アプタマーやリボザイムの機能を有する新規核酸がこれまでに多数見つかったこともその一つである。

しかし、20種類のアミノ酸からなるタンパク質に比べて、天然の核酸には4種類の塩基（2種類の塩基対）しかないという事実は、核酸の化学的・物理的多様性に限界を与えている。たとえば、生体中のtRNA、rRNA、mRNA等の機能性RNAは自分自身の構造を安定化したりRNA・RNA間、RNA・タンパク質間相互作用を安定化するために、様々な修飾塩基を利用している。したがって、新規機能性核酸の開発において、新たな塩基（対）のレパートリーを増やすことは大変有益であると考えられる。

核酸のさらなる機能拡張をめざして、非天然型塩基をもつヌクレオシド又はヌクレオチドの創製への取り組みが行われている。核酸に修飾塩基（もしくは非天然型塩基）を導入する手法として、1）化学合成により直接導入する方法、2）核酸合成酵素により導入する方法が考えられる。1）の場合は、アミダイトユニ

ットの安定性や塩基部分の適当な保護基が存在すること等化学合成上の問題の解決が必要である。また、これらの問題が解決されれば様々な非天然型塩基を位置選択的に導入できるが、その核酸の増幅は困難であり、長鎖長の核酸の合成も難しくなる。2) の場合は、もし、基質が酵素に認識され、人工塩基対間で相補的に複製、転写されれば、その核酸の増幅・調製が可能となるが、そのような基質や塩基対（非天然型ヌクレオチド）も未だ開発途中である。

非天然型人工塩基対の背景

天然の二本鎖DNA中のAとTおよびGとCは、それぞれ特異的な水素結合を介して互いに「排他的」な塩基対を形成している（図1a）。Bennerのグループはこの水素結合の様式に着目し、天然型塩基対の水素結合の組み合わせとは異なる新たな塩基対をデザインした。中でもisoG・isoCおよびκ・X塩基対（図1b）は、いろいろな核酸合成酵素によるDNA、RNA分子中への取り込みについての解析が報告されている [Piccirilli et al., 1990; Piccirilli et al., 1991; Switzer et al., 1993]。

しかしながら、1) isoGは1位と2位の間でケト・エノールの互変異性をおこすため、Tとも塩基対を形成してしまうこと、2) 最近の核酸合成酵素のX線結晶構造解析から核酸合成酵素との相互作用に重要である2位のケト基がisoCやKではアミノ基となっているため、核酸合成酵素の種類によっては基質として認識されないこと、3) isoCのヌクレオシド誘導体が化学的に不安定であること等の問題があり、これらの非天然型塩基対は現在ではほとんど使われていない。

一方、塩基の疎水性に着目して、水素結合をなくした疎水性塩基対がアメリカのグループから新たにデザインされた。まずKoolらのグループは、水素結合のドナーやアクセプターとなる原子および官能基を含まないアデニン誘導体とチミン誘導体をそれぞれ合成し、DNAへの取り込みを調べた。アデニン誘導体に相当するのが、4-メチルベンズイミダゾール（Z）あるいは9-メチル-1-Hイミダゾ [(4, 5) -b] ピリジン（Q）であり、チミン誘導体に相当するのが、2, 4-ジフルオロトルエン（F）である（図1c）。これらの疎水性塩

基対は対合する塩基間で水素結合をもたないが、大腸菌由来DNAポリメラーゼ I の K l e n o w フラグメントにより相補的にDNA中に取り込まれ、また A・F、Q・T、Z・T といった塩基対もそれぞれ相補的に取り込まれることが示された [M o r a l e s & K o o l, 1999]。

5 その後、R o m e s b e r g と S c h u l t z らのグループは、疎水性の塩基対を数多く合成し、それらの塩基対のDNA中への取り込みを網羅的に調べた。彼らの結果は疎水性の塩基同士が効率よく対合することを示しており、その一つの例がピロロピリジン (P P) と C 3 -メチルイソカルボステリル (M I C S) の塩基対である (図 1 d) [W u e t a l., 2000]。しかしながら、
10 疎水性塩基はシェイプフィッティングとは関係なく対合する性質があり、P P 同士や M I C S 同士の組み合わせでも効率よくDNA中に取り込まれてしまうという問題点がある。そして、K l e n o w フラグメントを用いた場合、シェイプフィッティングしていないこのような組み合わせの塩基を取り込んだ後では伸長反応がほとんど進行しない。

15 最近、7-アザインドール (7 A I) 同士の自己相補塩基対 (図 1 d) は、K l e n o w フラグメントと真核細胞由来のDNAポリメラーゼ β を組み合わせて用いると伸長反応が進行することが示されたが [T a e e t a l., 2001]、現段階ではこの方法も実用化には至っていない。

さらに、天然型塩基対と異なる水素結合様式をもち、かつ立体障害によって天然型塩基との対合を排除できるような塩基対を創出の研究が行われている。例えば、O h t s u k i e t a l., 2001 及び H i r a o e t a l., 2002 では、プリン の 6 位にかさ高い置換基を導入した 2-アミノ-6-ジメチルアミノプリン (x) と 2-アミノ-6-チエニルプリン (s)、そしてそのかさ高い置換基に相補する部位に水素原子をもったピリジン 2-オン (y) をデザインし、この x・y、s・y 塩基対形成を K l e n o w フラグメントによる DNA 中への取り込み効率により調べている (図 2)。その結果、鋳型中の x に対する y の取り込みは低い選択性しか示さなかったが、s に対する y の取り込みは、
25 比較的選択性も効率も良いことが示されている。

上記 s - y 塩基対の開発によって、RNA 中に選択的に y を導入することが可能になったので、y に機能性の置換基が結合した物質が得られれば、アプタマーやリボザイム等の新規機能性分子が創製可能になる。したがって、そのような y の誘導体の創製が希望されている。

5 発明の開示

本発明は、5 位置換 - 2 - オキソ (1 H) - ピリジン - 3 - イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチドを提供することを目的とする。

本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドは、好ましくは前記塩基の 5 位が、以下の

- 10 1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基；
- 2) アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体；
- 3) ビオチン又はその誘導体；あるいは
- 4) フルオレセイン、6 - カルボキシフルオレセイン、テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子
- 15 からなるグループから選択される置換基によって置換されている。5 位の置換基は、最も好ましくはヨウ素又はビオチン誘導体である。

本発明はまた、前記ヌクレオチドが組み込まれた核酸を提供することを目的とする。本発明の核酸は一態様において、前記ヌクレオチドと、6 位置換された 2 - アミノプリン - 9 - イル基を塩基として有するヌクレオチドとが塩基対を形成している。

20 本発明はさらにまた、前記ヌクレオチドが組み込まれた核酸を調製する方法を提供することを目的とする。本発明の方法は、

6 位置換された 2 - アミノプリン - 9 - イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を鋳型として転写、複製又は逆転写を行い、前記 6 位置換された 2 - アミノプリン - 9 - イル基を塩基として有するヌクレオチドの相補的な位置に、前記 5 位置換 - 2 - オキソ (1 H) - ピリジン - 3 - イル基を塩基として有するヌクレオチドを組み込むことを含む。

本発明はさらに、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸が、前記5位の置換基を介して共有結合している、核酸と1またはそれより多くの他分子(DNA、RNA、タンパク質等の生体分子がより好ましくは例示される)との多量体を提供することを目的とする。

本発明はまた、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を近接させて、前記5位の置換基を介して前記DNA同士、RNA同士、DNA/RNA、DNA/タンパク質又はRNA/タンパク質を共有結合させる、ことを含む、前記核酸と他分子(より好ましくは生体分子)との多量体の形成方法を提供することを目的とする。

図面の簡単な説明

図1は、既知の天然型塩基対と人工塩基対を示す。a)ワトソン・クリック塩基対。b)Bennerらによって報告された水素結合様式を変えた塩基対。c)Koolらによって報告された水素結合を持たない塩基対。d)RomesbergとSchultzらによって報告された疎水性塩基対。Rはsugarを示す。

図2は、水素結合様式の違いと立体障害(シェイプフィッティング)の概念をもとにデザインされた人工塩基対を示す。a)2-アミノ-6-ジメチルアミノプリン(x)とピリジン-2-オン(y)の塩基対。b)xと天然型ピリミジン塩基との塩基対。c)2-アミノ-6-チェニルプリン(s)とyの塩基対。d)sと天然型ピリミジン塩基との塩基対。

図3は、本発明の化合物、3-(β -D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステル及び3-(β -D-リボフラノシル)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステルの合成スキームを示す。

図4は、本発明の化合物、3-(β -D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステル(5IyTP)の構造及びUV吸収を示す。

a) 3-(β -D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステル(5 I y T P)。

b) 10 mMリン酸緩衝液(pH 7)中での5 I y T PのUV吸収。 $\lambda_{max} = 318 \text{ nm}$ 。

- 5 図5は、RNA 9 Aに5 I yを位置選択的導入するための鋳型DNAを調製する際に用いたプライマー(a)とRNA 9 Aの配列(b)を示す。(a)において、非天然型塩基sを含む箇所はsで示した。(b)において、RNA 9 A中の5 I yに導入する配列部分を下線で示した。

図6は、RNA 9 Aへの5 I yの位置選択的導入を示す。

- 10 a) 0.25 mMの5 I yが存在下(+)もしくは非存在下(-)で転写反応を行い、その反応産物を電気泳動した場合のオートラジオグラム。5 I yが導入される位置および全長の位置を左横に示した。

b) RNA 9 Aの二次構造上に、5 I yが導入される箇所を黒丸で示した。

- 15 図7は、転写反応産物の塩基組成分析を示す。0.25 mM 5 I yの存在下(c-e, h-j)もしくは非存在下(b, g)で転写された反応産物(全長; 図6参照)をRNase T₂で完全分解した後、2D-TLCで解析した。それぞれの塩基に相当するスポットの位置をa)、f)に示した。b-e) [α -³²P] ATPを用いて標識した場合。g-j) [α -³²P] GTPを用いて標識した場合。それぞれのスポットを定量した結果は、表1に示した。

- 20 図8は、5 I yを位置選択的に含むRNAの架橋反応を示す。各RNAとGST-RBDを混合して37°Cで30分間インキュベートした後、氷上でUVトランスイルミネーターを用いて、UV(312 nm)を1時間照射した。そのサンプルを電気泳動した場合のオートラジオグラム。RNA 9 A(5 I y 84)、9 A(5 I y 87)、9 A(5 I y 92)、9 A(5 I y 84/92)は、塩
25 基が84、87、92、84と92の位置に5 I yが導入されたRNA。9 A(5 I y)、9 A(5 I U)については、表2参照。UV照射により生じた架橋反応産物のバンドの位置を左横に示した。

図9は、RNA 9 A(5 I y 84)と9 A(5 I y 87)の架橋反応を示す。各RNAをGST-RBDの存在下(レーン2-4, 6-8)もしくは非存在

下（レーン 1, 5）で UV を照射した。照射後にプロテナーゼ K 処理（PK）もしくはフェノール・クロロホルム抽出（phenol）によりタンパク質を除去したが、架橋反応産物のバンドに変化はなかった（レーン 3, 4, 7, 8）。

図 10 は、RNA（5 I y 8 7）の架橋反応産物 XL は 9 A が二量化したもので、2 分子の GST-RBD と結合することを示す。a-d）各 RNA と GST-RBD との結合をゲルシフトアッセイにより解析した。c）各 RNA（a-d）の配列を示した。RNA 9 A の配列と異なる部分を太字・下線で示した。

図 11 は、Raf-1 RBD に結合する RNA アプタマーの *in vitro* セレクションの概略を示す。タンパク質がニトロセルロースフィルターに吸着することを利用したフィルター結合法によるセレクションを用いた。ランダム配列を含んだ RNA プールから Raf-1 RBD に結合した RNA を選別し、RT-PCR と転写反応により次のラウンドの RNA プールが増幅される。この一連の操作を繰り返すことで、Raf-1 RBD に結合する RNA 分子が濃縮される。

図 12 は、各 RNA アプタマーのタンパク質への結合曲線を示す。各 RNA アプタマー（2 nM）が種々の濃度のタンパク質へ結合する効率（Binding %）をフィルター結合法により求めてプロットした。

RNA 9 A の Raf-1 GST-RBD への結合： 黒丸

RNA 9 A の B-Raf GST-RBD への結合： 白丸

RNA 9 A の RGL GST-RBD への結合： ×

RNA 9 B の Raf-1 GST-RBD への結合： 黒四角

RNA 21.01 の Raf-1 GST-RBD への結合： 黒三角

図 13 は、RNA 9 A の二次構造を示す。RNase による限定分解と化学修飾を用いて、RNA 9 A の二次構造を予測した。固定領域を小文字で、ランダム領域を大文字で示した。RNase による切断パターンとアルキル化剤（DMS と CMCT）による修飾パターンを二次構造上にそれぞれマッピングした。Raf-1 GST-RBD の存在下、化学修飾がフットプリントされた配列部分を白丸で示した。

図14は、ピオチン-アビジンの相互作用を利用したRNAの固定化法を示す。図の左側は従来技術の説明であり、ピオチンを結合したDNAをアビジン化担体に結合し、これにRNAをハイブリダイズさせる方法（従来法1）、並びに、ピオチンを5位に結合したウリジンを転写によりRNA中にランダムに導入し、これをアビジン化担体に結合させる方法（図14、従来法2）を図示したものである。図の右側は、ピオチンを結合した第5番目の塩基を、人工塩基対を介して、転写によりRNA中の特定部位に導入させる、本発明の方法を図示したものである。

図15は、エチレン型リンカーを介してピオチンを結合させた本発明のy誘導体の合成を示す。

図16は、エチレン型リンカーを介してピオチンを結合させた本発明のyの誘導体の三リン酸化を示す。

図17は、アセチレン型リンカーを介してピオチンを結合させた本発明のy誘導体の合成を示す。

図18は、アセチレン型リンカーを介してピオチンを結合させた本発明のyの誘導体の三リン酸化を示す。

図19は、RNAへの $\text{Bio}-y\text{TP}$ （化合物6）および Bio^2-yTP （化合物13）の位置選択的導入を示す。1mM $\text{Bio}-y\text{TP}$ 又は Bio^2-yTP の存在下（+）、若しくは非存在下（-）で転写反応を行い、その反応産物を電気泳動した場合のオートラジオグラムを示した。 $\text{Bio}-y\text{TP}$ 又は Bio^2-yTP が導入された場合の産物の長さを右横に、導入されていない場合の産物の長さを左横に、それぞれ矢印で示した。

発明を実施するための最良の形態

非天然型塩基対 $s \cdot y$ を利用した場合には間違ったUの取り込みは無視できるほどの選択性を示し、mRNA中の特定の位置にyを導入して、 $s \cdot y$ 塩基対を新たなコドン・アンチコドン相互作用に利用できることが示された [Hirao et al., 2002]。本発明者らは、5位に置換基をもつy誘導体をRNA中に位置選択的に導入し、新たな機能をもつRNAの創製取り組み、本発明を想到した。

5 位置換－2－オキソ（1H）－ピリジン－3－イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチド

本発明は、5 位置換－2－オキソ（1H）－ピリジン－3－イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチドを提供する。本発明の5 位置換ピリジン塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチドは、ピリジン塩基の1，2又は6位に置換基を導入したヌクレオシド又はヌクレオチドと比較して、塩基間の不要な干渉（塩基対形成時の立体障害や不要な結合形成）が起こりにくいという利点を有する。

本発明における「ヌクレオシド」とは、核酸塩基と糖の還元基とがグリコシド結合によって結合した配糖体化合物を意味する。なお、前記「核酸塩基」は、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、及びこれら塩基の誘導体も含む概念である。前記「誘導体」の種類は特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、5 位置換－2－オキソ（1H）－ピリジン－3－イル基に相当する塩基や、2－アミノ－6－（2－チエニル）プリン－9－イル基に相当する塩基、などが挙げられる。「ヌクレオチド」は、前記ヌクレオシドの糖部分が、リン酸とエステルをつくっている化合物をいう。より好ましくは、1ないし3リン酸エステルである。ヌクレオシド又はヌクレオチドの糖部分はリボフラノシル、2'－デオキシリボフラノシル、あるいはハロゲンなどの置換基を2'位に有する2'－置換リボフラノシルであってもよく、また、リン酸部分は、チオリン酸であってもよい。つまり、糖部分およびリン酸部分は、公知のヌクレオシド、ヌクレオチド、あるいはこれらの誘導体にみられる構成をとっていればよい。糖部分がリボフラノシルであるリボヌクレオチドはRNAの構成成分となり、デオキシリボフラノシルであるデオキシリボヌクレオチドはDNAの構成成分となる。

本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドは、好ましくは前記塩基の5位が、以

25 下の

- 1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基；
- 2) アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体；
- 3) ピオチン又はその誘導体；あるいは

4) フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、テトラメチルー6-カルボキシローダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子からなるグループから選択される置換基によって置換されている。

1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基は、光照射することによりラジカルを発生させ、隣接する分子を共有結合する。限定されるわけではないが、例えば、ヨウ素の場合(5-ヨードy)、好ましくは約318nmUVを約1時間照射する。

限定されるわけではないが、5位の置換基は最も好ましくはヨウ素である。3-(β-D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オンの5'-三リン酸誘導体(5IyTP)の構造式は、図4a)に記載されている。

2) 本発明のヌクレオシド又はヌクレオチド中の塩基は、5位の置換基として、アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体を有することも可能である。

アルケニル、アルキニル、アミノ基、又はその誘導体は、他分子と疎水的あるいは親水的な相互作用に役立ち、例えば、アプタマーとそのターゲットとなる分子との間の相互作用を強めることができる。また、リボザイムの場合には、新たな活性部位を創製することが出来る。さらに、アミノ基の誘導体は、このものからビオチンや蛍光色素の結合した誘導体の合成中間体にもなる。

アルケニル基又はアルキニル基は、好ましくは、炭素数2ないし5、より好ましくは、炭素数2ないし3である。誘導体としては、例えば、 $-C\equiv CC_6H_5$ 、 $-C\equiv CCH_2NH_2$ 、 $-CH=CH-CH_2-NH_2$ が含まれる。好ましくは、 $-C\equiv CC_6H_5$ (2-フェニルエチニル基)である。

3) ビオチンは補酵素Rとも呼ばれ、ビタミンB群の1種である。ビオチンは、卵白中に含まれる糖タンパク質であるアビジンと特異的に結合し、複合体を形成することが知られている。よって、5位の置換基としてビオチンを有する本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドは、アビジンタンパク質に特異的に結合する。このため、ビオチンが結合した本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドを含む核酸は、アビジンを結合した担体と結合させることができるので、核酸を固定化

することができ、特定の分子に結合する核酸（アプタマーなど）を固定化すれば、例えば、特定物質の検出や単離に、また、診断試薬として利用できる。

5 ピオチンを核酸に結合させるための従来技術としては、第一にピオチンを結合した短いDNAを化学合成により調製し、これをアビジン化担体に結合し、これに相補性を有する核酸をハイブリダイズさせる方法がある（図14、従来法1）。DNAの合成とハイブリダイゼーションが含まれ、操作が煩雑になり、また、核酸の固定化の効率も、ピオチン-アビジンの結合ではなく、ピオチンを結合した短いDNAと、標的配列を含む相補配列とのハイブリダイゼーションに依存してしまう。

10 また、ピオチンを5位に結合したウリジンを用い、転写によりRNA中に（鋳型DNA中のAに相補して）ランダムにピオチンを導入し、これをアビジン化担体に結合させる方法も知られている（図14、従来法2）。この方法に関しては、Roche/Boehringer Mannheim、Clontech、Enzo、PerkinElmerの各社からピオチンを結合したウリジン（U）
15 （A、G、Cの誘導体もある）の基質が販売されている。しかしながら、鋳型DNA中のAに相補してRNA中に「ランダムに」ピオチンが結合したウリジンが導入されるという本質的な問題がある。その結果、固定化されたRNAの機能が失われたり、固定化の効率が低くなることがある。

20 従来技術に対して、ピオチンを結合した第5番目の塩基を人工塩基対を介して、転写により核酸中の特定部位に導入できれば、核酸のピオチン化、そして、それによる核酸の固定化が非常に簡便になる。本発明ではs-yという人工塩基対を用いて、これを可能にした。なお、本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドの5位の置換基としてピオチンを導入するためには、ピオチンを直接導入してもよいが、アミノアルキル基、アミノアルケニル基、アミノアルキニル基等から選択
25 されるリンカーを介することが好ましい。例えば、本実施例11-15（図15-18）では、エチレン型又はアセチレン型の2種類のリンカーを介して、ピオチンをyの5位に導入させた。本明細書において「ピオチン誘導体」とは、このようにヌクレオシド又はヌクレオチドに導入するために、リンカーを結合させたピオチンを含む。

4) 5位置換基として、フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、テトラメチル-6-カルボキシローダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子を有する場合、蛍光分子の種類に応じて、本発明のヌクレオチドを含む核酸の検出を行うことが可能である。よって、5位に蛍光分子を有する本発明のヌクレオチドを含む核酸は、標識核酸として当該核酸と相互作用する物質検出のプロ

5 ローブとして使用されうる。

限定されるわけではないが、例えば、フルオレセインの吸収極大波長は513 nm、蛍光極大波長は532 nmである。また、6-カルボキシフルオレセインの吸収極大波長は495 nm、蛍光極大波長は521 nm、テトラメチル-6-

10 カルボキシローダミンの吸収極大波長は555 nm、蛍光極大波長は580 nmである。それぞれの物質によって蛍光色が異なるため、多重染色に使用することも可能である。

本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチドの合成法は、特に限定されることなく、置換基の種類に応じて合成することができる。例えば、本明細書の実施例1に記載したように、3-(β-D-リボフラノシル)-ピリジン-2(1H)-オンに、先ず5位に置換基を導入し、次いで、3リン酸を導入してもよい。あるいは、3-(β-D-リボフラノシル)-ピリジン-2(1H)-オンに、先ず3リン酸を導入し、次いで、置換基を導入してもよい。また、2)アルケニル、アルキニル、アミノ基、又はその誘導体のような大きな基を導入する場合、先ず、ヨード等の光反応性基を導入して活性化してから、置換してもよい。また、置換基を導入する際の反応条件などは、ピリジンにこれら置換基を導入する反応の場合を参照して行うことができる。

15 20

本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドが組み込まれた核酸

25 本発明は、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドが組み込まれた核酸を提供する。本発明の核酸は、一本鎖又は二本鎖のRNA又はDNAを含む。二本鎖は、DNA/DNA、RNA/RNA、又はDNA/RNAであってもよい。また、DNAには、RNAを鋳型と

して逆転写してなるcDNAも含まれる。あるいは、核酸は3本鎖、4本鎖等も形成しうる。

本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドは、6位置換された2-アミノプリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチドとが塩基対を形成することが可能である。図2c)に示されたyとs(2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基)と同様に、本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基は、6位置換された2-アミノプリン-9-イル基と、2箇所で水素結合を生じる。6位置換された2-アミノプリン-9-イル基は、好ましくは2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基(s)又は2-アミノ-6-(ジメチルアミノ)プリン-9-イル基(x)である。より好ましくは、2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基(s)である。

本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基は、立体構造上、天然型プリン塩基A(アデニン)及びG(グアニン)とは塩基対を形成できない。そして、6位置換された2-アミノプリン-9-イル基は立体障害のため、天然型T(チミン)、U(ウラシル)及びC(シトシン)とは塩基対を形成できない。よって、本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基は、6位置換された2-アミノプリン-9-イル基と特異的に塩基対を形成することが可能である。

よって、本発明の核酸は、5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドと、6位置換された2-アミノプリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドとが塩基対を形成している、態様を含む。6位置換された2-アミノプリン-9-イル基は、好ましくは、2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基又は2-アミノ-6-(ジメチルアミノ)プリン-9-イル基である。

本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドは、転写、複製又は逆転写反応により、DNA又はRNA等の核酸に取り込むことが可能である。

限定されるわけではないが、本発明のヌクレオチドが組み込まれた核酸は、

6 位置換された 2-アミノプリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を鋳型として転写、複製又は逆転写を行い、前記 6 位置換された 2-アミノプリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドの相補的な位置に、本発明の核酸を組み込む

- 5 ことを含む、方法によって調製することが可能である。あるいは、天然型塩基を有するヌクレオシド又はヌクレオチドと同様に、化学合成によって DNA 又は RNA に取り込んでもよい。

- 10 例えば、5 位にヨウ素原子をもつウリジン(U)誘導体、5-ヨード U (5 I U) を転写反応により RNA 中に導入する場合には、UTP と 5 I UTP の存在比を変えて転写反応を行い、U の位置をランダムに 5 I U で置換するか、あるいは UTP の代わりに 5 I UTP だけを転写反応に用いて U の位置を全て 5 I U に置換するしかない。この場合、5 I U の導入によって RNA の高次構造が変化してしまったり、RNA の機能に支障をきたすこともある [Jensen et al., 1995]。これに対し、本発明の 5 位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基は、6 位置換された 2-アミノプリン-9-イル基と特異的に塩基対を形成する。よって、所望の位置に 6 位置換-2-アミノプリン-9-イル基が導入されている DNA 又は RNA を鋳型として、転写、複製又は逆転写反応を行うことにより、5 位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオシド又はヌクレオチドを位置選択的に導入することが可能となった。
- 15
- 20

- 25 転写、複製又は逆転写反応は公知の方法に従って行うことが可能である。限定されるわけではないが、例えば、転写反応は T7 RNA ポリメラーゼ (Takara 等)、複製反応は、クレノウフラグメント (KF)、逆転写反応は AMV Reverse Transcriptase XL (AMV-RT) (Life Science 社) を使用することが可能である。複製反応は、反応中に 6 位置換された 2-アミノプリン-9-イル基が除去されてしまうのを防ぐために、例えば、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性をもたない Taq DNA ポリメラーゼ (Takara Taq™) を用いて s を含むプライマーによる鋳型 DNA の PCR 増幅も可能である。

なお、6位置換された2-アミノプリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドは、公知の方法、例えば、[Fujiwara et al., 2001]に記載の方法で合成可能である。

5 本発明の、ヌクレオチドが組み込まれた核酸は、アンチセンスDNA若しくはRNA、リボザイム又はアプタマーとして使用されうる。アンチセンスDNA若しくはRNAとは、ある特定の遺伝子の発現を抑えるDNA又はRNAである。標的とする遺伝子配列（センス鎖）の全長又は部分配列に対して相補的という意味で名付けられた。人為的に遺伝子発現を調節する手法として使用されうる。本発明のヌクレオチドが組み込まれたアンチセンスDNA又はRNAは、非天然型
10 塩基を含むため標的に対する相補性が天然型塩基のみを使用した場合と比較して異なるものを創製しうる。リボザイムは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、広義のアンチセンスRNAに含まれる。アプタマーは、in vitro セレクション法によって得られた、特定の分子に結合する機能を有する核酸である。

15 例えば、in vitro セレクションによって得られる5位置換された2-オキソ（1H）-ピリジン-3-イル基を含むアプタマーは、標的タンパク質と架橋反応する等の新機能を持つRNA分子を創製することも可能となる。

まず、例えばsを含むプライマーを用いて鋳型DNAプールをPCRにより増幅し、これを転写して3'末端側の特定部位に5Iyを含むRNAプールを調製
20 する。このRNAプールから、光架橋反応を指標にしてin vitro セレクションを行い、特定のアプタマーを得ることができる。また、5IyはRNAアプタマー中の3'側に位置しているので、セレクションにおける逆転写反応の効率に悪影響を及ぼすことも少ない。さらに、疎水的な置換基を導入して、ターゲットとする物質とアプタマーとの疎水-疎水結合を強めるセレクションも可能で
25 ある。

また、5位の置換基としてピオチンを導入した核酸分子の調製も、転写反応で可能である。これは、アビジンとの相互作用を利用した例えばRNAの固相化や、多量体化に適用可能である。本明細書中で後述する実施例16では、人工塩基sを含む鋳型DNAを調製し、これに対して転写反応を行うことにより、その転

写産物にビオチン化されたヌクレオシド又はヌクレオチドを部位特異的に取り込むことに成功した。

5 なお、実施例 16 では、17-mer の配列中に、本発明の 5 位の置換基としてビオチンを導入した塩基を一つ導入する場合、その合成効率は、天然塩基対（GC 塩基対、又は AT 塩基対）における効率と比較して約 50% であった（図 19）。

10 さらに、蛍光分子を RNA アプタマー中に導入してアナライト（analyte）として活用する例も報告されている [Jhaveri et al., 2000; Yamamoto et al., 2000; Fang et al., 2001]。

15 これまでに、修飾塩基のヌクレオシドフルオレセイン-12-ウラシル（F-12-U）[Jhaveri et al., 2000]、5-（1-ペンチニル）ウラシル [Latham et al., 1994]、5-（3'-アミノプロピニル）ウラシル [Battersby et al., 1999]、5-ヨードウラシル（5IU）[Jensen et al., 1995]、5-プロモウラシル（5BrU）[Golden, et al., 2000] を in vitro セレクションで利用した例が報告されている。しかしながら、これらの例では全て、DNA もしくは RNA プールの調製の段階から修飾塩基を天然型塩基（T もしくは U）と置換している。本発明では、5 位置換-2-オキソ（1H）-ピリジン-3-イル基の、6 位置換された 2-アミノプリン-9-イル基との特異的な塩基対を利用して、転写反応の 1 段階で位置選択的に本発明のヌクレオチドを RNA に取り込むことが可能になった。本発明の非天然型の塩基を含む 5 種類の塩基からなる RNA を任意に調製出来れば、その有用性・汎用性は非常に高い。

25 また、本発明の、ヌクレオチドが組み込まれた DNA 又は RNA は、タンパク質、ペプチドの全体又は一部をコードするものであってもよい。

本発明のヌクレオチドを含む核酸と他分子（核酸、タンパク質等）含む多量体

本発明はさらに、5 位置換-2-オキソ（1H）-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸が、前記 5 位の置換基を介して共有結合

している、核酸と1またはそれより多くの他分子（DNA、RNA、タンパク質等の生体分子がより好ましくは例示される）との多量体を提供することを目的とする。

5 本発明はまた、5位置換-2-オキソ（1H）-ピリジン-3-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を近接させて、前記5位の置換基を介して前記DNA同士、RNA同士、DNA/RNA、DNA/タンパク質又はRNA/タンパク質を共有結合させる、ことを含む、前記核酸と他分子（より好ましくは生体分子）との多量体の形成方法を提供することを目的とする。

10 上述したように、本発明のヌクレオシド又はヌクレオチド中の5位置換-2-オキソ（1H）-ピリジン-3-イル基において、5位の置換基の種類によっては、近接する他分子と共有結合を結合しうる。

例えば、具体的には、5位置換基が1）ヨウ素、臭素から選択される光反応性基の場合、反応基の種類に応じた適当な波長の光照射を行うことにより、近接する他分子と共有結合を形成する。例えば、本明細書中の実施例で、参考例1で得
15 られたanti-(Raf-1)アプタマー（RNA 9A）に5Iyを位置選択的に導入して、ターゲットタンパク質（Raf-1 RBD）の存在下で架橋反応を行い、本発明の非天然型塩基の有用性を調べた。RNA 9A中の5Iyの導入部位として、RNAの高次構造の変化やピリミジンダイマー等の形成を出来る限り避けるため、RBDとの相互作用に重要でないとわかっている3'末端
20 側の領域のうち、プリン塩基に挟まれたC84、C87、A92を選んだ。そして、それぞれの位置に5Iyが選択的に導入された各RNAとN末端にGST（グルタチオントランスフェラーゼ）を融合させたRaf-1 RBD（GST-RBD）の存在下で光照射による架橋反応を行った。その結果、84又は87残基に5Iyを含むRNAは、架橋反応によりRNA同士の二量体を形成することがわかった。GSTタンパク質は溶液中で二量体を形成することから、GST-RBDも溶液中で二量体を形成し、RNA 9AがRaf-1 RBDに結合して5Iyを含む配列部分が近接したときに、RNA分子間の架橋反応が進行したと考えられる。この結果は、5IyがRNA間相互作用の解析に利用できることを示している。本発明において、5位置換-2-オキソ（1H）-ピリジン-3

ーイル基を塩基として有する核酸と他分子が近接するとは、5位の置換基と他分子が共有結合を形成しうるくらい、物理的に近位に配置されることを意味する。

本発明では5位の置換基間で水素結合等よりも強い共有結合が形成され架橋されるため、分離、精製等が可能であり、核酸と他分子の相互作用をより直接的に調べることも可能となった。架橋反応産物の解析は公知の方法、例えばゲルシフトアッセイ、クロマトグラフ、マスマスペクトル等によって行うことが可能である。なお、本発明の核酸と他分子は二量体のみならず、3又はそれより多くの多量体を形成することも可能である。

あるいは、本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するDNA又はRNAが結合しているタンパク質間相互作用を観察することも可能である。例えば、本明細書中の実施例では、Raf-1 RBDに結合するRNAアプタマーであるRNA 9Aについて、本発明のヌクレオシド又はヌクレオチドを位置選択的に導入すると、RNA分子間の二量体化が観察された。これは、実施例で使用したGST-RBDが溶液中で二量体を形成し、RBD部分に結合したRNA 9Aが近接したときにRNA分子間の架橋反応が進行したためと考えられる。GSTタンパク質は二量体を形成しやすく、実際にタンパク質を二量体化させるドメインとして利用されている。よって、本発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有するDNA又はRNAの架橋反応を利用して、架橋反応物の解析を行えば、当該DNA又はRNAが結合しているタンパク質同士の相互作用の解析も可能である。

あるいは核酸分子とタンパク質間の相互作用を強固にして、アプタマーによるターゲットタンパク質の活性の阻害や核酸・タンパク質の相互作用の解析などに有用な手法を提供することになる。例えば、ターゲットタンパク質の活性を阻害する既存のアプタマーは、共有結合でターゲットタンパク質と結合しているわけではないので、そのタンパク質の活性を完全に阻害することはできない。しかし、5 I yを含むアプタマーを用いて、光照射によりターゲットタンパク質にアプタマーを共有結合させることにより、そのタンパク質の活性を完全に阻害することも可能である。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

5 実施例 1 3 - (β-D-リボフラノシル) - 5 - ヨードピリジン - 2 (1H) - オン 5' - 三リン酸エステルの合成

 (1) 3 - (β-D-リボフラノシル) - 5 - ヨードピリジン - 2 (1H) - オンの合成 (図 3 の 1 → 2).

 3 - (β-D-リボフラノシル) - ピリジン - 2 (1H) - オン 342 mg (1.5 mmol) (Matulic-Adamic, J., Beigelman, L., Tetrahedron Lett., 1997, 38, p. 203-206.; Ishikawa, M., Hirao, I., Yokoyama, S., Tetrahedron Lett., 2000, 41, p. 3931-3934)、ヨウ素 573 mg (2.3 mmol)、ヨウ化カリウム (KI) 657 mg (7.9 mmol) を、50 mM 炭酸ナトリウム 36 ml に加え、110℃で12時間加熱した。反応後にジクロロメタンを加え、水層を分離し、ジクロロメタンで洗浄した。水層を減圧濃縮後 C18 逆相 HPLC で精製し、3 - (β-D-リボフラノシル) - 5 - ヨードピリジン - 2 (1H) - オン 155 mg を得た。

20 (2) 3 - (β-D-リボフラノシル) - 5 - ヨードピリジン - 2 (1H) - オン 5' - 三リン酸エステル

 の合成 (図 3 の 2 → 4)

 上記 (1) の 3 - (β-D-リボフラノシル) - 5 - ヨードピリジン - 2 (1H) - オン 0.1 mmol、プロトンスポンジ 48 mg (0.23 mmol) をトリメチルホスフェート 500 μl に溶解し、0℃に冷却した。オキシ塩化リン (POCl₃) 13 μl (1.3 当量) を加え、0℃で4-5時間攪拌した。トリ-n-ブチルアミン 119 μl (5.0 当量)、次いで 0.5 μM ビストリブチルアンモニウムピロホスフェート (ジメチルホルムアミド溶液) 1.0 ml (5.0 当量) (Ludwig, J., Eckstein, F., J. Org. Chem., 1989, 54, p. 631-635

5) を加える。30分後0.5Mトリエチルアンモニウムピカーボネート500 μ lを攪拌する。反応液をDEAEセファデックスA-25、次いで、C18逆相HPLCで精製し、標題化合物3-(β -D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステル(本明細書において、場合により「5 I y T P」と呼称する)を得た。

ESI-Mass

計算値: 593.05、実測値: 591.70 (M-H)

実施例2 3-(β -D-リボフラノシル)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステルの合成

10 (1) 3-(β -D-リボフラノシル)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2(1H)-オンの合成(図3の2 \rightarrow 3)

実施例1(1)の3-(β -D-リボフラノシル)-5-ヨードピリジン-2(1H)-オン71mg(0.20mmol)をDMF1.0mlに溶解した。次いで、CuI6mg(0.032mmol)、トリエチルアミン
15 42 μ l(0.30mmol)、フェニルアセチレン33 μ l(0.30mmol)及びPd(Ph₃P)₄11mg(0.010mmol)を加え、アルゴン雰囲気下、室温で6時間攪拌した。酢酸エチル10mlを加えた後、水10mlづつで3回抽出した。水層を合わせ、減圧下で濃縮した。逆相HPLCで精製し、白色の3-(β -D-リボフラノシル)-5-(2-フェニル
20 エチニル)-ピリジン-2(1H)-オン60mg(92%)を得た。

¹H-NMR(270.16MHz、メタノール-d₄) ; δ 7.86(d, 1H, J=0.8, 2.4Hz, 6), 7.62(dd, 1H, J=0.3, 2.4Hz, 4), 7.46(m, 2H, フェニル), 7.35(m, 3H, フェニル), 4.85(d, 1H, J=4.9Hz, 1'), 4.12(t, 1H, J=4.9Hz, 3'), 4.00-4.07(m, 2H, 2', 4'), 3.84(dd, 1H, J=2.7, 12.2Hz, 5'), 3.70(dd, 1H, J=3.8, 12.2Hz, 5')。ESI-

MS (negative) ; 325.85 [M-H] . $\lambda_{max} = 287 \text{ nm}$ ($\epsilon = 7.7 \times 10^3$)

(2) 3-(β -D-リボフラノシル)-5-(2-フェニルエチニル)-
 -ピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸エステルの合成 (図3の3
 5 → 5)

上記(1)の5-(2-フェニルエチニル)-3-(β -D-リボフラノ
 シル)-ピリジン-2(1H)-オン14mg (0.043mmol) およ
 び1,8-ビス(ジメチルアミノ)ナフタレン14mg (0.068mmol)
 1)を、トリメチルホスフェート0.43mlに溶解した。氷冷下オキシ塩
 10 化りん5.2 μ l (0.056mmol)を加え、0℃で2時間攪拌した。
 トリブチルアミン52 μ l及び0.5Mピストリブチルアンモニウムピロホ
 スフェート(ジメチルホルムアミド溶液)0.43mlの混合液を加え、0
 ℃で10分間攪拌した。TEAB 5ml (50mmol)を加え、4℃で、
 DEAEセファデックス陰イオン交換カラムで0.05-1Mグラディエン
 15 トTEABで精製した。標題化合物3-(β -D-リボフラノシル)-5-
 (2-フェニルエチニル)-ピリジン-2(1H)-オン 5'-三リン酸
 エステルを含む画分を凍結乾燥し、27mg (65%)の目的化合物を得た。
 。最終物をさらに逆相HPLCで精製した。

ESI-MS (negative) ; 565.58 [M-H]

20 実施例3 非天然型塩基を含むヌクレオシド三リン酸の濃度およびモル吸光 係数の決定

本願発明の5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基とし
 て有するヌクレオシド又はヌクレオチド等の、非天然型塩基を含む各ヌクレオチ
 ド(dNTP/NTP)の濃度は、アルカリフォスファターゼによりリン酸エス
 25 テル結合を分解後、無機リン酸の含有量を求めることで決定した。また、各ヌク
 レオシド三リン酸のモル吸光係数イプシロン(ϵ)の値は、10mM リン酸緩
 衝液(pH7)中での極大吸収波長および波長260nmにおける吸光度Abs
 (Absorbance)を測定して、計算式 $\epsilon = \text{Abs} / \text{Conc}$ (Conc
 : dNTP/NTP濃度)から ϵ を決定した。

実施例 1 で作成した 5 I y T P の U V 吸収について図 4 に示した。5 I y T P は、吸収極大波長が 3 1 8 n m 付近である。

アルカリフォスファターゼによるリン酸エステル結合の分解反応は、ヌクレオシド 5' - 三リン酸、5 0 m M T r i s - H C l p H 9 . 0、1 m M M g C l ₂、2 0 単位のウシの腸由来のアルカリフォスファターゼ (T a K a R a) を含む反応溶液 (4 0 μ l スケール) を 4 2 ° C で 1 時間インキュベートすることにより行った。リンの定量は、C h e n の方法に従って行った [C h e n e t a l . , 1 9 5 6] 。反応溶液の半量 2 0 μ l を 4 m l の水と 4 m l の試薬 C (6 N 硫酸、蒸留水、2 . 5 % モリブデン酸アンモニウム溶液、1 0 % L - (+) アスコルビン酸を体積比 1 : 2 : 1 : 1 で混合した溶液) に加えて、3 7 ° C で 2 時間振盪しながら反応させた、反応後のサンプルを室温に戻してから 8 2 0 n m の吸光度を測定して、検量線からリンの含有量を算出した。

実施例 4 RNA 9 A に 5 I y T P を位置選択的に導入するための鋳型 DNA の調製

15 上述した 2 - アミノ - 6 - チエニルプリン (s)、そしてそのかさ高い置換基に相補する部位に水素原子をもったピリジン - 2 - オン (y) からなる s · y 塩基対は P C R による DNA の増幅に耐えられるほどの選択性がない。しかしながら、s を含むプライマーを用いた P C R で鋳型 DNA を増幅することができる。そこで、参考例 1 で得られた RNA 9 A (全長 1 0 0 ヌクレオチド) 中の R a f - 1 R B D との相互作用に重要でないとわかっている 3' 末端側の領域のうち、プリン塩基に挟まれた C 8 4、C 8 7、A 9 2 を 5 I y の導入部位として選んだ。

25 具体的には、まず P C R 反応の鋳型には、参考例 1 で得られたベクター T O P O - 9 A (アプタマー RNA 9 A がサブクローニングされたベクター) を B a m H I で 1 箇所切断して直鎖状にした二本鎖 DNA (d s DNA) を用いた。RNA 9 A は、本明細書中の配列番号 1 及び図 5 b) に示した 1 0 0 塩基からなる配列を有する。図 5 b) 中下線で示した、8 4、8 7 及び 9 2 は、5 I y を導入する部分である。P C R 用のプライマーとしては、配列番号 2 の塩基配列からな

るセンスプライマー及び配列番号 3-7 のいずれかの塩基配列からなるアンチセンスプライマーを用いた。

センスプライマー

5	ggtaatacga ctcactatag ggagtggagg aattcatcg	39	(配列番号 2)
アンチセンスプライマー			
	gcagaagctt gctgtcgcta aggcatatg	29	(配列番号 3)
	gcagaagctt gctgtcscta aggcatatg	29	(配列番号 4)
	gcagaagctt gctstcgcta aggcatatg	29	(配列番号 5)
10	gcagaagcst gctgtcgcta aggcatatg	29	(配列番号 6)
	gcagaagcst gctgtcscta aggcatatg	29	(配列番号 7)

センスプライマー (配列番号 2) の塩基 19-39 は、RNA 9A (配列番号 1) の塩基 1-20 に相当する。配列番号 2 の 3-18 は、T7 プロモーターに
15 相補的な配列を含む。

3' 末端側のアンチセンスプライマーとして、RNA 9A (配列番号 1) の
固定領域 (72-100) に相補的な配列をもつ 29.45、s を 1 箇所だけ含
む 29.45 s 84、29.45 s 87、29.45 s 92、s を 2 箇所含むプ
ライマー 29.45 s 84/92 を化学合成した。(図 5b)、これらのプライ
20 マーを用いた以下の PCR により s を含む鋳型 DNA を増幅した。

なお、プライマーに使用される 2-アミノ-6-チエニルプリン (s) のフォ
スフォアミダイトは、公知の方法、例えば、[Fujiwara et al.
, 2001] に記載の方法で合成可能である。

PCR 反応は、PCR 中に s が除去されてしまうことを防ぐため、3' → 5'
25 エキソヌクレアーゼ活性がない Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa TaqTM) を用いて行った。反応組成は、10mM Tris-HCl pH 8
. 3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、
1 μM の各プライマー、1 ng/μl 鋳型 dsDNA、0.025 U/μl
Taq DNA ポリメラーゼである。反応は PTC-100TM Progr

am Thermal Controllerを用いて[94°C、30秒-40°C、30秒-60°C、1分]×15もしくは20サイクル、60°C 5分の条件で行われた。

反応溶液をフェノールクロロホルム抽出した後、上清をエタノール沈殿して
 5 PCR産物を回収した。sがプライマー中で比較的3'末端側に位置する29.45s84および29.45s84/92を用いた場合、PCRの増幅効率が若干低下したが、転写反応に十分な純度のPCR産物を得ることができた(図省略)。PCR産物を10mM NaClを含む10mM Tris-HCl (pH 7.6)に溶かして保存し、以降のT7転写反応の鋳型とした。

10 実施例5 T7 RNAポリメラーゼによる転写反応

本実施例では、実施例4で得られたPCR産物を鋳型とし、T7 RNAポリメラーゼによる転写反応によって、実施例1で作成した5Iyを3'末端側の特定の位置に導入した種々のRNA 9A変異体を作成した。

T7転写反応の組成はOhtsuki et al., 2001に記載された
 15 ものと同様である。具体的には、40mM Tris-HCl pH8.0、5mM DTT、24mM MgCl₂、2mM スペルミジン、0.01% Triton X-100、10mM GMP、1mM NTPs、0-0.25mM 5IyTP、0.2μl/μl 鋳型DNA、2.5U/μl T7 RNAポリメラーゼ(TaKaRa)である。37°Cで6時間酵素反応を行い、反応産物
 20 を8%ポリアクリルアミド-7M尿素ゲルで電気泳動して精製した。

図6a)は、0.25mMの5Iyが存在下(+)又は非存在下(-)で転写反応を行い、その反応産物を電気泳動した場合のオートラジオグラムを示す。図6b)は、RNA 9Aの2次構造上に、5Iyが導入される箇所を黒丸で示したものである。図6に示されたように、0.25mMの5Iyリボヌクレオシド三リン酸(5IyTP)の存在下、効率よく転写反応が進行し、全長100ヌクレ
 25 オチドの産物をゲル電気泳動により確認できた。

なお、5IyTPの代わりに実施例2で作成した3-(β-D-リボフラノシル)-5-(2-フェニルエチニル)-ピリジン-2(1H)-オン 5

’-三リン酸エステルを用いた場合にも、同様に転写反応が行われることが確認された。

実施例 7 転写反応産物の塩基組成分析

実施例 6 で得られた全長の反応産物中に 5 I y がどれだけ選択的に導入されているかを調べるため、RNA の塩基組成分析を行った。[α - 32 P] ATP もしくは [α - 32 P] GTP 存在下で T7 転写反応を行った場合、A もしくは G の 5' 側に隣接するヌクレオシド 3' -リン酸 (Np) がそれぞれ 32 P で標識される。したがって、ゲルから精製された RNA を RNase T₂ (Sigma) を用いて Np に完全分解した。84、92 残基の位置に 5 I y が導入されてい
5
れば 5 I y のヌクレオシド 3' -リン酸 (5 I yTp) が [α - 32 P] GTP
10
により 32 P で標識され、87 残基の位置であれば [α - 32 P] ATP により標識される (図 5、図 6-b)。完全分解された産物を 2D-TLC で分離してそれぞれのヌクレオチドを定量した 5 I y を含む RNA の塩基組成分析を行った。

具体的には、RNA の完全分解では、ラベルされた RNA と 0.25 OD の E
15
. coli 由来 tRNA 混合物 (Sigma) を含む水溶液 4.25 μ l に 0.75 μ l の RNase T₂ 溶液 (5 単位/ μ l ; 100 mM NaOAc pH 4.5、10% グリセロール) を加えて、37°C で一晩酵素反応を行った。反応溶液の一部を 10 cm \times 10 cm の TLC 板 (フナセル SF ; フナコシ) にスポットして二次元に展開した。一次元目および二次元目の展開液の組成は、
20
イソ酪酸 66 : アンモニア 1 : 水 33 (体積比)、および 2-プロパノール 70 : 塩酸 15 : 水 15 (体積比) である。展開後のスポットをバイオイメーjing アナライザー (BAS 2500、富士フィルム) で検出して、それぞれ定量した。

結果を図 7 及び表 1 に示す。

表 1. 転写反応産物の塩基組成分析

RNA	³² P label	5lyTP	Ap	Gp	Cp	Up	5lyp	misincorporation*
9A	ATP	-	5.91(6)	5.97(6)	7.02(7)	6.11(6)		
	ATP	+	5.92(6)	6.01(6)	6.95(7)	6.10(6)	0.10(0)	0.45%
	GTP	-	7.84(8)	4.91(5)	4.19(4)	5.06(5)		
	GTP	+	7.77(8)	5.03(5)	4.18(4)	4.93(5)	0.09(0)	0.41%
9A(5ly84)	ATP	+	5.91(6)	5.99(6)	7.02(7)	5.97(6)	0.12(0)	0.41%
	GTP	+	7.81(8)	5.00(5)	3.10(3)	5.13(5)	0.97(1)	
9A(5ly87)	ATP	+	5.86(6)	5.98(6)	6.11(6)	6.03(6)	1.04(1)	
	GTP	+	7.93(8)	5.03(5)	4.04(4)	4.94(5)	0.06(0)	0.27%
A(5ly92)	ATP	+	4.89(5)	5.94(6)	7.09(7)	5.97(6)	0.11(0)	0.46%
	GTP	+	6.90(7)	5.02(5)	4.23(4)	4.86(5)	0.98(1)	
9A(5ly84/92)	ATP	+	5.09(5)	5.74(6)	7.07(7)	5.98(6)	0.12(0)	0.5%
	GTP	+	6.94(7)	4.98(5)	3.16(3)	4.92(5)	2.00(2)	

各数値は以下の式により算出された。かっこ内は理論上のヌクレオチドの数を示す。

$$\frac{[\text{各ヌクレオチド(Np)の } ^{32}\text{P のカウント}] \times [\text{AもしくはG**の 5'末端のヌクレオチドの総数}]}{[\text{全ヌクレオチドの } ^{32}\text{P のカウント}]}$$

* [5 I y pの数値] / [AもしくはG**の 5'末端のヌクレオチドの総数] × 100 (%)。

** Gの場合は、p G pのカウントを除いて計算した。

その結果、鋳型中の s に対して 5 I yが高い選択性で取り込まれ (97%以上)、誤った 5 I yの取り込みは全体の僅か 0.5%以下であった。以上より、sを含むプライマーを用いてプラスミド中の配列から PCRで鋳型を調製することにより、5 I yを RNA中に位置選択的に導入できることがわかった。

実施例 8 5 I yが導入された各 RNAの R a f - 1 R B Dへの結合効率

本実施例では、5 I yが位置選択的に導入された各 RNAの R a f - 1 R B Dに対する結合活性の変化を調べるために、フィルター結合法により結合効率を

求めた（表2）。1箇所5 I yが導入された9 A（5 I y 8 4）、9 A（5 I y 8 7）、9 A（5 I y 9 2）は5 I yを含まないRNA 9 Aと同程度の結合効率を示した。2箇所に5 I yが導入された9 A（5 I y 8 4／9 2）では結合効率が低下した。一方、5－ヨードU（5 I U）が1分子あたり平均5～6塩基分ランダムに導入されたRNA 9 A（5 I U）でも結合能が落ちた。以上の結果から、少なくとも5 I yをRNA 9 Aの8 4、8 7、9 2残基の1箇所にのみ導入した場合はアプタマーの結合活性に与える影響がほとんどなく、位置選択的に5 I yを導入できる本手法が有益であることがわかった。

表2 5 I yが導入された各RNAのR a f - 1 R B Dへの結合効率

RNA	Raf-1 RBD binding %	Filter binding %
9A	25 (5)	0.2 (0.1)
9A(5IU) ^a	16 (3)	0.3 (0.2)
9A(5Iy) ^b	24 (2)	0.08 (0.03)
9A(5Iy84)	21 (5)	0.1 (0.1)
9A(5Iy87)	22 (2)	0.06 (0.04)
9A(5Iy92)	25 (2)	0.1 (0.1)
9A(5Iy84/92)	15(2)	0.2 (0.1)

各RNAのR a f - 1 R B Dへの結合効率をフィルター結合法により求めた（R a f - 1 R B D／RNA = 3 0 0 : 5 nM）。実験は3回行い、その平均値を示した。かっこ内の数値は標準偏差。^a 0. 4 mMの5 I U T P存在下、sを含まない鋳型DNAから転写されたRNA 9 A。^b 0. 2 5 mMの5 I y T P存在下、sを含まない鋳型DNAから転写されたRNA 9 A。

実施例9 UV照射による架橋反応

本実施例では、5 I yを位置選択的に含む各RNAを用いて、光照射による架橋反応性を調べた。

まず、5'末端が³²Pで標識されたRNAを緩衝液A中で7 5℃で3分加温した後に室温で1 0分以上放置して、RNAの二次構造を形成させた。一方、R

a f - 1 RBDは、ヒト R a f - 1のRBD（アミノ酸残基51-131番）をGST（グルタチオントランスフェラーゼ）融合タンパク質として大腸菌内で発現し、菌体を破碎後の上清からカラムクロマトグラフィーで精製した。r a t RGLのRBD（アミノ酸残基632-734番）[Koyama et al., 1996] およびhuman B-RafのRBD（アミノ酸残基149-226番）もGST融合タンパク質として大腸菌内で発現し、同様に精製した。

二次構造を形成させたRNAの溶液に等容量のR a f - 1 GST-RBD溶液（RBDの他、BSA 160 μ g/ml、1mM DTT、7.3%グリセロールを緩衝液Aに溶かしたもの）を加えて37°Cで30分間インキュベーションしてRNA・RBDの複合体を形成させた。そして、氷上にセットした96穴のマルチウェルプレート（COASTAR社）のウェルにそのサンプルを40-120 μ lずつ分注した。300nm以下の波長のUVを減少させるためにポリスチレンの蓋をしてからUVトランスイルミネーター（TVC-312R/J Spectronics社、UV波長312nm）を用いて約1cmの距離からUVを1時間照射した。

光源に用いたUVの波長は、5IyTPの吸収極大波長が318nm付近であることを考慮して選択された（図4）。一方、UVトランスイルミネーターを用いた場合には、照射波長が270-400nmと広がってしまう（8/15W medium wave UV-B fluorescent tubeのスペクトル表より。図省略）[Meisenheimer & Koch, 1997]。そこで本実施例では、天然型塩基の吸収波長と重なる300nm以下の光を出来る限り減少させるため、サンプルにポリスチレン製の蓋をしてUVを照射した。

反応溶液を8%ポリアクリルアミド-7M尿素ゲルで電気泳動して、生成物を解析した。また、架橋反応産物を回収する際には、反応溶液をフェノール・クロロホルム抽出した後、電気泳動で分離してゲルから抽出した。その結果、84又は87残基に5Iyを含むRNA 9A（5Iy84）と9A（5Iy87）におい

て、未反応のRNA（100ヌクレオチド）と異なる位置に、架橋反応産物のバンドがはっきり検出された（図8 レーン6及び8）。

架橋反応産物が何であるかを同定することにした。RNA 9AはRaf-1 RBDに結合するアプタマーなのでRNAとGST-RBD間の架橋反応が一つの反応機構として考えられる。GST-RBD非存在下でUVを照射したところ、架橋反応産物のバンドが僅かではあるが検出された（図9 レーン1及び5）。そこで、GST-RBD存在下でUVを照射した後にproteinase K処理（PK）やフェノール・クロロホルム抽出（phenol）によってタンパク質を除去してみたが、そのバンドに変化はなかった（図9 レーン2-4、及び6-8）。

以上の結果から、架橋反応産物はRNA・タンパク質（GST-RBD）間の架橋反応に由来するものではないことがわかった。そして、RNAだけで架橋反応産物が検出されることと、架橋反応産物のバンドの移動度がほぼRNA 9A二量体分に相当すること（図省略）から、GST-RBD存在下でRNAが二量化したものが架橋反応より得られたと考えられる。そして、タンパク質共存下で、このアプタマーの2量化が促進されることもわかった。

実施例10 RNA 9Aの架橋反応による2量体化

GSTタンパク質は二量体を形成しやすく、実際にタンパク質を二量体化させるドメインとして利用されている[Inouye et al., 2000]。したがって、本実施例で用いたGST-RBDも溶液中で二量体を形成し、RBD部分に結合したRNA 9Aが近接したときにRNA分子間の架橋反応が進行したと考えられる。その場合には、架橋反応産物はRaf-1 RBDとの結合活性も保持したままである可能性がある。

そこで、9A（51y87）とRaf-1 RBDを等濃度0.1 μ Mで混合させた条件で架橋反応させた産物（XL）をゲルから精製して、XLとGST-RBDとの結合をゲルシフトアッセイにより調べた。また、RNA 9Aの二量体のコントロールとして、RNA 9Aをタンデムに連結させたRNA 9A \times 2（全長200ヌクレオチド）も新たに調製し、ゲルシフトアッセイを行った。RNA 9A \times 2は、RNA 9Aの必須領域（1-80残基部分）を分子内に2つ

もつ全長200ヌクレオチドのRNAであり、T7 RNAポリメラーゼ (Epicentre) を用いた転写反応により調製し、ベクターpCR®II-TOPO (Invitrogen) にサブクローニングされている。

ゲルシフトアッセイ

- 5 5'末端が ^{32}P で標識されたRNA (0.8 pmol) を20 μl の緩衝液A中で75°Cで3分加温した後に室温で10分以上放置して、RNAの二次構造を形成させた。このRNA溶液に、20 μl の緩衝液Aに溶かしたE. coli由来tRNA混合物の溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigmaから購入したサンプルをゲル精製したもの) を加えて、5分以上室温で放置した後、その溶液を
- 10 5 μl ずつ分注した。これに5 μl のRaf-1 GST-RBD溶液 (RBDの他、BSA 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1mM DTT、10%グリセロールを緩衝液Aに溶かしたもの) を加えて、37°Cで30分間インキュベートした後、非変性5%ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=39:1) 電気泳動により解析した。
- 15 電気泳動は、室温、定電圧 (150 V) で約2時間行った (ゲルサイズ16 cm \times 16 cm \times 1 mm)。泳動用緩衝液の組成は、12.5mM Tris、12.5mM Glycineである。泳動後のゲルはゲルドライヤーを用いて乾燥させ、バイオイメージングアナライザー (BAS 2500、富士フィルム) で解析した。
- 20 その結果、予想通り、RNA XL 1分子とGST-RBD 2分子は効率よく複合体を形成することがゲルシフトのバンドパターンからわかった (図10c) また、GST-RBD非存在下のRNA XLのバンド移動度はRNA 9A \times 2とほぼ同じだったことから、XLはRNA 9Aが二量化したものであることが確認できた (図10c及びd)。また、2分子のGST-RBDとの結合
- 25 活性は、RNA 2 \times 9AよりもRNA XLの方が高いことがゲルシフトのパターンから示唆された。これは、GST tagで二量化したRaf-1 RBDの配向とRNA XLのRBDへの結合部分がうまく合致しているためと考えられる。それに対してRNA 9AはGST-RBDと1:1で結合した複合体を形成した (図10a)。また、Raf-1 RBDへの結合が無視できる

ほど弱いRNA 0 Cは、GST-RBD濃度を増やしてもゲルシフトは認められなかった（図10b）。

以上の結果から、5 I yを位置選択的にRNA 9 Aに導入することによりGST-RBDに依存したRNA間での架橋反応性を付与できることが明らかとなり、5 I yが分子間相互作用の解析に応用できること、そして、新たな機能をもつ核酸の創製において人工塩基対s・5 I yが有用であることがわかった。

参考例1 Raf-1タンパク質に特異的に結合するRNA アプタマーの単離

本参考例では、Raf-1タンパク質に特異的に結合するRNA アプタマーをin vitroセレクション法により単離した。このRNA分子は、タンパク質間相互作用を制御する細胞情報分子として機能することを示した。

Raf-1タンパク質は、細胞質に発現される分子量74 kDaのセリン／トレオニンプロテインキナーゼであり、がん遺伝子として発見されたc-raf-1の遺伝子産物である[Rapp et al., 1988]。哺乳類細胞では、Raf-1のアイソフォームとしてA-Raf、B-Rafが存在することが知られている。Raf-1の活性化は、膜結合型タンパク質であるRasとの相互作用により引き起こされ、そしてRas以外のタンパク質もその制御機構に関与していることがわかってきている[Kolch, 2000]。Rasタンパク質は、がん遺伝子として発見されたrasの遺伝子産物であり、GDPまたはGTPと結合する低分子量Gタンパク質である[Campbell et al., 1998]。他のGタンパク質と同様に、RasはGTPと結合した状態が活性化型である。このGTP結合型Rasは、Raf-1のアミノ酸残基51-131番からなるドメイン(Ras-binding domain; RBD)と結合することが同定されている。Raf-1の活性化には、Ras・Raf相互作用によって引き起こされる膜上での何らかの構造変化や、他の因子とのさらなる相互作用等が必要であると考えられている。

本参考例では、in vitroセレクション法を用いて、Ras・Raf相互作用のみを選択的に阻害する制御分子の創製を試みた。核酸との相互作用が知られていないタンパク質に対しても、in vitroセレクション法を用いる

ことで、そのタンパク質に特異的に結合するDNAやRNA分子（アプタマー）を人工的に得ることができる。この *in vitro* セレクション法は、選択・増幅の一連の操作（ラウンド）を繰り返すことにより、ランダムな配列を含んだ核酸のライブラリー（プール）から特定の機能を有する分子種を選別する手法である（図11） [Ellington & Szostak, 1990]。

本参考例では、細胞情報伝達における Ras と Raf-1 の相互作用を選択的に制御する新規 RNA 分子の創製をめざし、*in vitro* セレクション法により Raf-1 RBD に特異的に結合する RNA アプタマーを単離した。60 ヌクレオチド (N_{60}) のランダム配列を含むプールから得られた RNA アプタマーは、Raf-1 RBD と Ras の相互作用を阻害した。しかし、この RNA アプタマーの阻害能は弱く、Ras に対して大過剰の RNA が阻害に必要となった。そこでセレクション法を一部改良し、新たにデザインした 45 ヌクレオチド (N_{45}) の RNA ランダム配列を含むプールを用いてセレクションを行った。RT-PCR 産物を TOPO TA Cloning Kit Dual (Invitrogen) により TA クローニングベクター pCR®II-TOP O にサブクローニングし、個々のクローンの塩基配列を、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。その結果、さらに阻害能の高い二種類の RNA アプタマー (RNA 9A、RNA 9B) が得られた。

とりわけ阻害能の高かった RNA 9A は、Ras および Raf-1 を発現させた Sf9 細胞の膜画分および HEK293 細胞の細胞質画分を用いた無細胞系で、Ras による Raf-1 の活性化を強く阻害し、人為的制御分子として機能することがわかった。また RNA 9A は、Raf-1 のアイソフォームである B-Raf の RBD に結合するにも関わらず（図12）、B-Raf RBD と Ras の相互作用は阻害せず、Ras・Raf-1 相互作用に対する阻害は特異的であることがわかった。また、RNase による限定分解、化学修飾を用いた RNA の二次構造解析、そして RNA を切り詰めた RNA バリエーションでの実験結果から、RNA 9A はシュードノット構造を形成することが予測された（図1

3)。また、化学修飾を用いたフットプリンティングにより R a f - 1 R B D と相互作用する R N A 9 A の領域を調べた結果、特定のループ部分が R a f - 1 R B D との結合表面に位置することが示唆された。

実施例 11 エチレン型リンカーを介してビオチンを結合させた γ 誘導体の合

5 成(図 15)

N-アリルビオチンアミド (図 15 の化合物 2) の合成

アルゴン置換した 100 ml フラスコ中で 251 mg (0.735 mmol) の b i o t i n - N - h y d r o x y s u c c i n i m i d e (化合物 1) (S i g m a - A l d r i c h) を 26.7 ml の乾燥 DMF に溶解させたものに 5
10 0 μ l (0.668 mmol) の a l l y l a m i n e (ナカライテスク) を加え、アルミホイルで遮光し、室温で攪拌した。反応の進行は C 18 逆相 HPLC でモニターした (HPLC 条件; カラム、 μ -Bondsphere ϕ 19 x 150 mm (W a t e r s) ; 移動相、H₂O 中、20% アセトニトリル; 溶出速度、10 ml / 分; 検出方法、UV 吸収 (200 nm)) 。反応開始から 3
15 時間後で原料の b i o t i n - N - h y d r o x y s u c c i n i m i d e がほぼ完全に化合物 2 に変化していることが確認された。この反応溶液をそのまま次の反応に用いた。

20 ビオチニル化 5 - (3-アミノ-1-プロペニル) - 3 - (β -D-リボフラノシル) - 2-ピリドン (図 15 の化合物 4) 及びビオチニル化 5 - (3-アミノ-1-プロペン-2-イル) - 3 - (β -D-リボフラノシル) - 2-ピリドン (図 15 の化合物 5) の合成

化合物 2 の反応溶液 (0.668 mmol の化合物 2 が 26.7 ml の乾燥 DMF に溶解しているもの) に、118 mg (0.334 mmol) の 5 - i o d o - 3 - (β -D-ribofuranosyl) - 2-pyridone (I - r y , 化合物 3) と 98.3 mg (0.334 mmol) の d i s o d i u m t e t r a c h l o r o p a l l a d a t e (S i g m a - A l d r i c h) を 26.7 ml の 0.1 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.2) に溶解させたものを加え、アルゴン雰囲気中、室温で 20 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を蒸留によって除き、残渣を H₂O に懸濁させた。これを逆相カラム (固定相、C o

smosi 1 140 C18-prep (ナカライテスク) ; 移動相、H₂O
 中、40% アセトニトリル) に通した後、生成物を含むフラクション (UV吸
 収 (260 nm) で検出) を回収し、エバポレートした。得られた残渣をH₂O
 に溶かし、C18 逆相HPLCで生成物の精製を行った (HPLC条件; カラム
 5、 μ -Bondsphere ϕ 19 x 150 mm (Waters) ; 移動相、
 溶媒A=H₂O、溶媒B=H₂O中50% アセトニトリル、0-15分、10
 -80% B、15-15.5分、80-100% B、15.5-18分、1
 00% B、18-19分、100-10% B、19-24分、10% B ;
 溶出速度、10 ml / 分 ; 検出方法、UV吸収 (260 nmおよび318 nm)
 10) 。生成物のHPLC精製後の収率は47.4 mg (0.093 mmol、化合
 物3より27.9%) であった。

ここで精製したものは4と5の化合物の混合物となっていた。化合物4と5を
 分離するために、別の条件で再度HPLC精製を行った (HPLC条件; カラム
 、 μ -Bondsphere ϕ 19 x 150 mm (Waters) ; 移動
 15 相、9% アセトニトリル in H₂O ; 溶出速度、10 ml / 分 ; 検出方法
 、UV吸収 (260 nmおよび318 nm)) 。得られた4と5の量の比はそれ
 ぞれの化合物の¹H-NMRにおけるエチレンプロトン (化合物4に関しては-
 CH=CH-、化合物5に関しては>C=CH₂) の積分値の比から求め、4 :
 5 = 0.53 : 0.47 であった。

20 化合物4に関する構造解析データ ; ¹H-NMR (DMSO-d₆) , δ (p
 pm) 1.19-1.68 (6H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(O)NH-), 2.10 (2H, t, -CH₂-C(O)NH-, J=7.3 Hz),
 2.57 (1H, d, -CHCH₂S-, J=12.7 Hz), 2.81 (1H
 , dd, -CHCH₂S-, J=4.7, 12.4 Hz), 3.06-3.12
 25 (1H, m, -CHCHS-), 3.34-3.66 (2H, m, H5', 5'
 '), 3.76-3.93 (5H, m, H2', 3', 4', -C(O)NHC
 H₂-), 4.09-4.14 (1H, m, -NHCHCHS-), 4.27-
 4.32 (1H, m, -NHCHCH₂S-), 4.66-4.71 (2H, m
 , H1', 3'-OH), 5.04-5.13 (2H, m, 2'-OH, 5'-

OH), 5.93 (1H, dt, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$, $J=5.5, 16.0$ Hz), 6.25 (1H, d, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$, $J=15.8$ Hz), 6.36 (1H, s, $-\text{NHCHCH}_2\text{S}-$), 6.42 (1H, s, $-\text{NHCHCHS}-$), 7.32 (1H, s, H6), 7.90 (1H, s, H4), 7.96 (1H, t, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $J=5.1$ Hz), 11.72 (1H, bs, H1); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), δ (ppm) 25.3, 28.2, 35.1, 55.4, 59.2, 61.1, 70.7, 74.4, 81.0, 83.6, 115.2, 123.6, 125.7, 130.7, 131.7, 134.1, 160.9, 162.5, 171.6; Electron spray mass spectrum, $[\text{M}-\text{H}]^-$ (negative) = 507.30 (found), 507.19 (calcd.), $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (positive) = 531.28 (found), 531.19 (calcd.); UV absorption spectrum (H_2O), λ_{max} = 262 nm, 325 nm, λ_{min} = 291 nm.

15 化合物5に関する構造解析データ; ^1H -NMR (DMSO- d_6), δ (ppm) 1.12–1.64 (6H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$), 2.08 (2H, t, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $J=7.1$ Hz), 2.55 (1H, d, $-\text{CHCH}_2\text{S}-$, $J=12.5$ Hz), 2.81 (1H, dd, $-\text{CHCH}_2\text{S}-$, $J=5.1, 12.4$ Hz), 2.99–3.06 (1H, m, $-\text{CHCHS}-$), 3.46–3.67 (2H, m, H5', 5'), 3.79–4.10 (6H, m, H2', 3', 4', $-\text{C}(\text{O})\text{NHCCH}_2-$, $-\text{NHCHCHS}-$), 4.26–4.31 (1H, m, $-\text{NHCHCH}_2\text{S}-$), 4.67–4.71 (2H, m, H1', 3'-OH), 5.04–5.13 (3H, m, 2'-OH, 5'-OH, $>\text{C}=\text{CH}_2$), 5.38 (1H, s, $>\text{C}=\text{CH}_2$), 6.36 (1H, s, $-\text{NHCHCH}_2\text{S}-$), 6.41 (1H, s, $-\text{NHCHCHS}-$), 7.34 (1H, d, H6, $J=2.3$ Hz), 7.96 (1H, d, H4, $J=1.8$ Hz), 8.06 (1H, t, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $J=5.6$ Hz), 11.79 (1H, bs, H1); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), δ (ppm) 25.4, 28.1, 3

5. 1, 41. 0, 55. 4, 59. 1, 61. 0, 70. 4, 74. 4, 81
. 0, 83. 4, 110. 5, 115. 5, 129. 9, 130. 2, 135.
4, 139. 9, 160. 8, 162. 5, 171. 8; Electron s
pray mass spectrum, $[M-H]^{-}$ (negative) =
5 507. 29 (found), 507. 19 (calcd.), $[M+Na]^{+}$
(positive) = 531. 25 (found), 531. 19 (calcd.) ; UV absorption spectrum (H_2O), λ_{max} =
259 nm, 314 nm, λ_{min} = 286 nm.

実施例 12 エチレン型リンカーを介してピオチンを結合させた y の誘導体の

10 三リン酸化 (図 16)

ピオチニル化 5 - (3-アミノ-1-プロペニル) - 3 - (β -D-リボフ
ラノシル) - 2-ピリドン 5'-トリホスフェート (Bio-yTP, 図 16
の化合物 6) の合成

アルゴン置換した 5 ml フラスコに 37. 3 mg (0. 073 mmol) の化
15 合物 4 と 23. 6 mg (0. 11 mmol) の Proton Sponge (S
igma-Aldrich) を入れ、734 μ l の trimethylphos
phate (ナカライテスク) に懸濁させ、氷水中で 15 分間攪拌した。ここに
8. 9 μ l (0. 095 mmol) の phosphorus oxychlor
ide (ナカライテスク) を加え、4℃で 29 時間攪拌した後、733 μ l (0
20 . 367 mmol) の 0. 5M bis (tri-n-butylammon
ium) pyrophosphate-DMF 溶液と 87 μ l (0. 367 mmol)
の tri-n-butylamine を加えさらに 30 分間攪拌した。その
後、367 μ l の 0. 5M TEAB (pH 7. 5) を加え反応を停止させた
。この溶液から DEAE-Sephadex A-25 column (カラム
25 、DEAE-Sephadex A-25 (Amersham Biosci
ences) ϕ 15 mm x 300 mm、移動相; 50 mM-1M TEAB (p
H 7. 5) linear gradient) によって化合物 6 を精製した
。

ピオチニル化 5 - (3 - アミノ - 1 - プロペン - 2 - イル) - 3 - (β - D - リボラノシル) - 2 - ピリドン 5' - トリホスフェート (図 16 の化合物 7) の合成

アルゴン置換した 5 ml フラスコに 33.1 mg (0.065 mmol) の化合物 5 と 20.9 mg (0.098 mmol) の Proton Sponge (Sigma-Aldrich) を入れ、325 μl の trimethyl phosphate (ナカライテスク) に懸濁させ、氷水中で 15 分間攪拌した。ここに 7.9 μl (0.085 mmol) の phosphorus oxychloride (ナカライテスク) を加え、4℃で 23 時間攪拌した後、650 μl (0.325 mmol) の 0.5 M bis (tri-n-butyl ammonium) pyrophosphate-DMF 溶液と 77 μl (0.325 mmol) の tri-n-butyl amine を加えさらに 30 分間攪拌した。その後、325 μl の 0.5 M TEAB (pH 7.5) を加え反応を停止させた。この溶液から DEAE-Sephadex A-25 column (カラム、DEAE-Sephadex A-25 (Amersham Biosciences) φ15 mm x 300 mm、移動相; 50 mM - 1 M TEAB (pH 7.5) linear gradient) によって化合物 7 を精製した。

実施例 13 アセチレン型リンカーを介してピオチンを結合させた γ 誘導体の合成 (図 17)

N - プロパルギル - ジクロロアセトアミド (図 17 の化合物 9) の合成

アルゴン置換した 100 ml フラスコ中で 1.37 ml (20 mmol) の propargyl amine (化合物 8) (Sigma-Aldrich) と 2.02 g (24 mmol) の NaHCO₃ (ナカライテスク) を 40 ml の CH₂Cl₂ に加え、氷上で攪拌した。ここに dichloroacetyl chloride (ナカライテスク) 2.12 ml (22 mmol) を滴下し、室温で 3 時間攪拌した。この溶液を 5% NaHCO₃ 水溶液 40 ml で 1 回、飽和 NaCl 水溶液 40 ml で 2 回洗浄した後、有機層を Na₂SO₄ で乾燥させた。

これをろ過した後、エバポレートし、化合物9を得た。得られた化合物9は2.60 g (15.7 mmol, 78.3%)であった。

化合物9に関する構造解析データ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm) 2.26 (1H, t, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $J=2.6\text{ Hz}$), 4.06 (2H, dd, $-\text{CH}_2-$, $J=2.6, 5.3\text{ Hz}$), 5.88 (1H, s, $\text{Cl}_2\text{CH}-$), 6.62 (1H, bs, $-\text{NH}-$).

5-(ジクロロアセチル-3-アミノ-1-プロピニル)-3-(β -D-リボフラノシル)-2-ピリドン (図17の化合物10の合成)

5ml フラスコに71mg (0.20 mmol) の5-iodo-3-(β -D-ribofuranosyl)-2-pyridone (I-ry、化合物3) を入れ、乾燥アセトニトリルで2回共沸した。これを1ml の乾燥DMFに溶解させ、6.1mg (0.032 mmol) のCuI (ナカライテスク)、42 μ l (0.30 mmol) のtriethylamine (ナカライテスク)、50mg (0.30 mmol) の化合物9、および12mg (0.010 mmol) のPd(PPh₃)₄ (ナカライテスク) を加え、アルゴン雰囲気中室温で19時間攪拌した。反応終了後、EtOAc/H₂Oで抽出を行い、有機層を10ml のH₂Oで2回洗浄した。水層をエバポレートし、0.22 μ mのフィルターユニットでろ過した後、C18逆相HPLCで生成物の精製を行った (HPLC条件; カラム、 μ -Bondsphere $\phi 19 \times 150\text{ mm}$ (Waters); 移動相、溶媒A=H₂O、溶媒B=アセトニトリル、0-10分、5-20% B、10-18分、20% B、18-19分、20-5% B、19-24分、5% B; 溶出速度、10ml/分; 検出方法、UV吸収 (260 nmおよび318 nm))。生成物(10)のHPLC精製後の収率は25.2mg (0.064 mmol, 32.2%)であった。

化合物10に関する構造解析データ; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm) 3.45-3.75 (2H, m, H5', 5''), 3.78-3.87 (3H, m, H2', 3', 4'), 4.16 (2H, d, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $J=5.3\text{ Hz}$), 4.64 (1H, d, H1', $J=4.3\text{ Hz}$), 4.70 (1H, d, 3'-OH, $J=4.8\text{ Hz}$), 4.90 (1H, t,

5' -OH, $J=5.4\text{ Hz}$), 5.07 (1H, bs, 2' -OH), 6.47 (1H, s, $\text{Cl}_2\text{CH}-$), 7.54-7.57 (2H, m, H4, 6), 9.09 (1H, t, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $J=5.1\text{ Hz}$), 12.02 (1H, bs, H1); Electron spray mass spectrum, $[\text{M}-\text{H}]^-$ (negative) = 389.16 (found), 389.03 (calcd.), $[\text{M}+\text{H}]^+$ (positive) = 391.20 (found), 391.05 (calcd.); UV absorption spectrum (H_2O), $\lambda_{\text{max}}=259\text{ nm}$, 316 nm, $\lambda_{\text{min}}=280\text{ nm}$.

10 5 - (3-アミノ-1-プロピニル) - 3 - (β -D-リボフラノシル) - 2-ピリドン (図17の化合物11) の合成

スクリュウキャップ付きのガラス瓶に化合物10を45mg (0.12mmol) 入れ、5mlの H_2O に溶解させた。ここに28%アンモニア水を1ml加え、室温で26時間攪拌した。

15 ビオチニル化5 - (3-アミノ-1-プロピニル) - 3 - (β -D-リボフラノシル) - 2-ピリドン (図17の化合物12) の合成

化合物11の反応溶液を5mlフラスコに移し、エバポレートした。得られた残渣を乾燥アセトニトリルで3回共沸した後、43mg (0.13mmol) の biotin-N-hydroxysuccinimide (Sigma-Aldrich) を加え、1mlの乾燥DMFに溶解させた。これを室温で2時間攪拌した後、5mlの H_2O を加え、C18逆相HPLCで生成物の精製を行った (HPLC条件; カラム、 μ -Bondsphere $\phi 19 \times 150\text{ mm}$ (Waters); 移動相、溶媒A= H_2O 、溶媒B=アセトニトリル、0-15分、10-40% B、15-15.5分、40-50% B、15.5-18分、50% B、18-19分、50-10% B、19-24分、10% B; 溶出速度、10ml/分; 検出方法、UV吸収 (260nmおよび318nm))。生成物(12)のHPLC精製後の収率は35.9mg (0.071mmol、化合物10より61.6%)であった。

20

25

化合物 12 に関する構造解析データ ; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) , δ
 (ppm) 1.23-1.62 (6H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$) , 2.09 (2H, t, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $J=7.4\text{ Hz}$) , 2.56 (1H, d, $-\text{CHCH}_2\text{S}-$, $J=12.9\text{ Hz}$) , 2.80 (1H, dd, $-\text{CHCH}_2\text{S}-$, $J=5.1, 12.5\text{ Hz}$) , 3.04-3.11 (1H, m, $-\text{CHCHS}-$) , 3.47-3.62 (2H, m, H5', 5'') , 3.78-3.87 (3H, m, H2', 3', 4') , 4.04 (2H, d, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $J=5.4\text{ Hz}$) , 4.09-4.12 (1H, m, $-\text{NHCHCHS}-$) , 4.26-4.31 (1H, m, $-\text{NHCHCH}_2\text{S}-$) , 4.63 (1H, d, H1', $J=4.6\text{ Hz}$) , 4.71 (1H, d, 3'-OH, $J=4.8\text{ Hz}$) , 4.92 (1H, t, 5'-OH, $J=5.3\text{ Hz}$) , 5.11 (1H, bs, 2'-OH) , 6.34 (1H, s, $-\text{NHCHCH}_2\text{S}-$) , 6.41 (1H, s, $-\text{NHCHCHS}-$) , 7.53 (2H, s, H4, 6) , 8.27 (1H, t, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $J=5.4\text{ Hz}$) , 11.93 (1H, bs, H1) ; Electron spray mass spectrum, $[\text{M}-\text{H}]^-$ (negative) = 505.23 (found) , 507.18 (calcd.) , $[\text{M}+\text{H}]^+$ (positive) = 507.26 (found) , 507.19 (calcd.) , $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (positive) = 529.26 (found) , 529.17 (calcd.) ; UV absorption spectrum (H_2O) , $\lambda_{\text{max}}=259\text{ nm}$, 318 nm , $\lambda_{\text{min}}=280\text{ nm}$.

実施例 14 アセチレン型リンカーを介してピオチンを結合させた y の誘導体の三リン酸化 (図 18)

ピオチニル化 5-(3-アミノ-1-プロピニル)-3-(β -D-リボフラノシル)-2-ピリドン 5'-トリホスフェート ($\text{Bio}^2\text{-yTP}$, 図 18 の化合物 13) の合成

アルゴン置換した 5ml フラスコに 25.6mg (0.05mmol) の化合物 12 と 16.2mg (0.075mmol) の Proton Sponge (Sigma-Aldrich) を入れ、250 μ l の trimethylpho

sphate (ナカライテスク) に懸濁させ、氷水中で15分間攪拌した。ここに6 μ l (0.065mmol) のphosphorus oxychloride (ナカライテスク) を加え、4℃で8時間攪拌した後、500 μ l (0.25mmol) の0.5M bis (tri-n-butyl ammonium) pyrophosphate-DMF溶液と60 μ l (0.25mmol) のtri-n-butyl amineを加えさらに30分間攪拌した。その後、250 μ lの0.5M TEAB (pH7.5) を加え反応を停止させた。この溶液からDEAE-Sephadex A-25 column (カラム、DEAE-Sephadex A-25 (Amersham Biosciences) ϕ 15mm x 300mm、移動相; 50mM-1M TEAB (pH 7.5) linear gradient) によって化合物13を精製した。

実施例15 Bio-yTP (化合物6)、Bio²-yTP (化合物13) の濃度およびモル吸光係数の決定

方法

Bio-yTP、Bio²-yTPの濃度は、アルカリフォスファターゼによりリン酸エステル結合を分解後、無機リン酸の含有量を求めることで決定した。また、ヌクレオシド5'-三リン酸のモル吸光係数、イプシロン (E)、の値は、10mMリン酸緩衝液 (pH7) 中での極大吸収波長および波長260nmにおける吸光度Abs (Absorbance) を測定して、計算式 $E = Abs / Conc$ (Conc:ヌクレオシド5'-三リン酸の濃度) より決定した。

アルカリフォスファターゼによるリン酸エステル結合の分解反応は、ヌクレオシド5'-三リン酸、50mM Tris-HCl pH9.0、1mM MgCl₂、20unitsのCalf intestine由来のアルカリフォスファターゼ (TaKaRa) を含む反応溶液 (40 μ lスケール) を42℃で1時間インキュベートすることにより行った。リンの定量は、Chenの方法に従って行った [Chen et al.、1956]。反応溶液の半量20 μ lを4mlの水と4mlのReagent C (6N 硫酸、蒸留水、2.5%モリブデン酸アンモニウム溶液、10%L- (+) アスコルビン酸を体積比1:2:1:1で混合した溶液) に加えて、37℃で2時間振とうしながら反応させた。

反応後のサンプルを室温に戻してから 820 nm の吸光度を測定して、検量線からリンの含有量を算出した。

結果

Bio-yTP の極大吸収波長は 326 nm および 262 nm であり、その波
 5 長でのイプシロンの値はそれぞれ $E_{326} = 7.5 \times 10^3$ および $E_{262} = 2.9 \times 10^4$ であった。また、 $E_{260} = 2.8 \times 10^4$ であった。Bio²-yTP の極大吸収波長は 317 nm および 258 nm であり、その波長でのイプシロンの値はそれぞれ $E_{317} = 5.3 \times 10^3$ および $E_{258} = 1.8 \times 10^4$ であった。また、 $E_{260} = 1.8 \times 10^4$ であった。

10 実施例 16 RNA への Bio-y および Bio²-y の位置選択的導入

方法

RNA への酵素反応による Bio-y および Bio²-y の位置選択的導入は、s を含む DNA (temp35s; 35-mer) (配列番号 8) を鋳型とした T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応により行われた (図 19)。temp
 15 p35s もしくはコントロールの鋳型鎖 temp35A (配列番号 9) と相補的な配列を含む DNA (T7prim28N; 28-mer) (配列番号 10) を、10mM NaCl を含む 10mM Tris-HCl (pH 7.6) 中で混合し、アニーリング操作により二本鎖とし、転写反応に用いた。

T7 転写反応は 20 μl スケールで行い、その組成は 40mM Tris-H
 20 Cl pH 8.0、5mM DTT、8mM MgCl₂、2mM スペルミジン、0.01% Triton X-100、10mM GMP、1mM NTPs (N=A、G、C、U、Bio-yTP、Bio²-yTP)、2 μCi α-³²P] ATP、0.5 μM 二本鎖 DNA、2.5 U/μl T7 RNA ポリメラーゼ (TaKaRa) である [Ohtsuki et al., 2001
 25]。37°C で 3 時間酵素反応を行い、等量の 10M 尿素を含む TPE 溶液を加えて 75°C で 3 分加温して反応を終了させた。そして、反応溶液の一部を 20% ポリアクリルアミド-7M 尿素ゲルで電気泳動して、[α-³²P] ATP によりラベルされた反応産物をバイオイメーキングアナライザー (BAS 2500、富士フィルム) で解析した。

結果

1 mMのATP、GTP、Bio-yTPの存在下では、鋳型中のsに対してBio-yがRNA中に取り込まれ、15-merの産物をゲル電気泳動により確認できた（図19、レーン2）。同様に、Bio-yTPとATP、GTP、さらにUTPの共存下でも、Bio-yTPが競合して、鋳型中のsに対して選択的に取り込まれた15-merの産物（図19、レーン4）を確認できた。また、Bio-yTPとATP、GTP及びCTP、あるいはATP、GTP、UTP及びCTPの共存下でも、Bio-yTPが競合して、鋳型中のsに対して選択的に取り込まれた17-merの産物（図19、レーン6、8）を確認できた。

ここでは、Bio-yを含むRNAがBio-yを含まない同じ長さのRNAと比較して移動度が小さくなることを利用して、Bio-yが取り込まれた転写反応産物かどうかを電気泳動のバンドパターンにより区別することにより、鋳型DNAのsに相補したBio-yのRNA中への選択的な取り込みを確認した（図19、レーン2-8）。また、図19のレーン10ではBio-yを含むRNA 17-merに相当するバンド（図19、レーン8）が検出されず、鋳型中のsを含まない天然ヌクレオチドに対するBio-yの誤った取り込みはほとんどないことが示唆された。以上の結果から、sを含む鋳型DNAを用いたT7転写反応により、Bio-yをRNA中に位置選択的に導入できることがわかった。

Bio²-yTPでも、Bio-yTPと同様の結果を得た。1 mMのATP、GTP、Bio²-yTPの存在下で、鋳型DNA中のsに対してBio²-yTPがRNA中に取り込まれ（図19、レーン12）、ATP及びGTPに加えてUTP及び／又はもしくはCTPの共存下でも、Bio²-yTPが競合して、鋳型中のsに対して選択的に取り込まれた（図19、レーン14、16、18）。また、鋳型中の天然ヌクレオチドに対するBio²-yの誤った取り込みは見られず（図19、レーン20）、Bio²-yをRNA中に位置選択的に導入できることがわかった。

なお、 $s \cdot Bio-y$ もしくは $s \cdot Bio^2-y$ 塩基対を用いた転写反応効率は、全長17-merのRNAのバンドを比較することにより算出された。その結果、天然塩基対を用いた転写反応効率を100%とした場合、 $s \cdot Bio-y$ もしくは $s \cdot Bio^2-y$ 塩基対を用いた場合で約50%であった（図19、レーン18、19、21）。

参考文献

以下の文献は、参考文献としてその内容が本明細書中に援用される。

1. Battersby, T.R., Ang, D.N., Burgstaller, P., Jurczyk, S.C., Bowser, M.T., Buchanan, D.D., Kennedy, R.T. & Benner, S.A. (1999) Quantitative Analysis of Receptors for Adenosine Nucleotides Obtained via In Vitro Selection from a Library Incorporating a Cationic Nucleotide Analog. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 9781-9789.
2. Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J. & Der, C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17, 1395-1413.
3. Chen, P.S., Toribara, T.Y. & Warner, H. (1956) Microdetermination of Phosphorus. *Anal. Chem.* 28, 1756-1758.
4. Ellington, A.D. & Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.
5. Fang, X., Cao, Z., Beck, T. & Tan, W. (2001) Molecular aptamer for real-time oncoprotein platelet-derived growth factor monitoring by fluorescence anisotropy. *Anal. Chem.* 73, 5752-5757.
6. Fujiwara, T., Kimoto, M., Sugiyama, H., Hirao, I. & Yokoyama, S. (2001) Synthesis of 6-(2-Thienyl)purine Nucleoside Derivatives That Form Unnatural Base Pairs with Pyridin-2-one Nucleosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 2221-2223.

7. Golden, M.C., Collins, B.D., Willis, M.C. & Koch, T.H. (2000) Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers. *J. Biotechnol.* 81, 167-178.

8. Hirao, I., Madin, K., Endo, Y., Yokoyama, S. & Ellington, A.D. (2000) RNA aptamers That Bind to and Inhibit the Ribosome-inactivating Protein, Pepocin. *J. Biol. Chem.* 275, 4943-4948.

9. Hirao, I., Nojima, T., Mitsui, T. & Yokoyama, S. (2001) Synthesis of DNA templates containing the Fifth base, 2-Amino-6-(dimethylamino)purine, for Specific Transcription Involving Unnatural Base Pairs. *Chem. Lett.* 914-915.

10. Hirao, I., Ohtsuki, T., Fujiwara, T., Mitsui, T., Yokogawa, T., Okuni, T., Nakayama, K., Takio, K., Yabuki, T., Kigawa, T., Kodama, K., Yokogawa, T., Nishikawa, K. & Yokoyama, S. (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogs in to proteins. *Nat. Biotechnol.* 20, 177-182.

11. Inouye, K., Mizutani, S., Koide, H. & Kaziro, Y. (2000) Formation of the Ras Dimer Is Essential for Raf-1 Activation. *J. Biol. Chem.* 275, 3737-3740.

12. Ishikawa, M., Hirao, I. & Yokoyama, S. (2000) Synthesis of 3-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)pyridin-2-one and 2-amino-6-(N,N-dimethylamino)-9-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)purine derivatives for an unnatural base pair. *Tetrahedron. Lett.* 41, 3931-3934.

13. Jensen, K.B., Atkinson, B.L., Willis, M.C., Koeh, T.D. & Gold, L. (1995) Using in vitro selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein to high-affinity RNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12220-12224.

14. Jhaveri, S., Rajendran, M. & Ellington, A.D. (2000) In vitro selection of signaling aptamers. *Nat. Biotechnol.* 18, 1293-1297.

1 5 . Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351, 289-305.

1 6 . Koyama, S., Chen, Y.-W., Ikeda, M., Muslin, A.J., Williams, L. T. & Kikuchi, A. (1996) Ras-interacting domain of RGL blocks Ras-dependent signal transduction in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 380, 113-117.

1 7 . Latham, J.A., Johnson, R. & Toole, J.J. (1994) The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel thrombin aptamers containing 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Res.* 22, 2817-2822.

1 8 . Ludwig, J., Eckstein, F., *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 631-635.

1 9 . Matulic-Adamic, J., Beigelman, L., *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 203-206.

2 0 . Meisenheimer, K.M. & Koch, T.H. (1997) Photocross-Linking of Nucleic Acids to Associated Proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 101-40.

2 1 . Morales, J.C. & Kool, E.T. (1999) Minor Groove Interactions between Polymerase and DNA: More Essential to Replication than Watson-Crick Hydrogen Bonds? *J. Am. Chem. Soc.* 121, 2323-2324.

2 2 . Ohtsuki, T., Kimoto, M., Ishikawa, M., Mitsui, T., Hirao, I. & Yokoyama, S. (2001) Unnatural base pairs for specific transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4922-4925.

2 3 . Piccirilli, J.A., Krauch, T., Moroney, S.E. & Benner, S.A. (1990) Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet. *Nature* 343, 33-37.

2 4 . Piccirilli, J.A., Moroney, S.E. & Benner, S.A. (1991) A C-nucleotide base pair: methylpseudouridine-directed incorporation of formycin triphosphate into RNA catalyzed by T7 RNA polymerase. *Biochemistry* 30, 10350-10356.

2 5 . Rapp, U.R., Heidecker, G., Huleihel, M., Cleverland, J.L., Choi, W.C., Pawson, T., Ihle, J.N. & Anderson, W.B. (1988) raf family serine/threonine protein kinases in mitogen signal transduction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 53, 173-184.

5 2 6 . Switzer, C.Y., Moreney, S.E. & Benner, S.A. (1993) Enzymatic Recognition of the Base Pair between Isocytidine and Isoguanosine. Biochemistry 32, 10489-10496.

2 7 . Tae, E.L., Wu, Y., Xia, G., Schultz, P.G. & Romesberg, F.E. (2001) Efforts toward Expansion of the Genetic Alphabet: Replication of RNA with Three Base Pairs. J. Am. Chem. Soc. 123, 7439-7440.

10 2 8 . Wu, Y., Ogawa, A.K., Berger, M., McMinn, D.L., Schultz, P.G. & Romesberg, F.E. (2000) Efforts toward Expansion of the Genetic Alphabet: Optimization of Interbase Hydrophobic Interactions. J. Am. Chem. Soc. 122, 7621-7632.

15 2 9 . Yamamoto, R., Baba, T. & Kumar, P.K. (2000) Molecular beacon aptamer fluorescences in the presence of Tat protein of HIV-1. Genes Cells. 5, 389-396.

請求の範囲

1. 5位置換-2-オキソ(1H)-ピリジン-3-イル基を塩基として有
5 するヌクレオシド又はヌクレオチド。
2. 前記塩基の5位が、以下の
 - 1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基；
 - 2) アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体；
 - 3) ビオチン又はその誘導体；あるいは
 - 10 4) フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、テトラメチル-6-カルボキシローダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子からなるグループから選択される置換基によって置換されている、請求項1に記載のヌクレオシド又はヌクレオチド。
3. 前記塩基の5位が、1) ヨウ素、臭素から選択される光反応性基、2
15) アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体、又は3) ビオチン又はその誘導体で置換されている、請求項1又は2に記載のヌクレオシド又はヌクレオチド。
4. 前記塩基の5位がヨウ素又はビオチン誘導体で置換されている、請求項1ないし3のいずれか1項に記載のヌクレオシド又はヌクレオチド。
- 20 5. 請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヌクレオチドが組み込まれた、核酸。
6. 請求項1ないし4のいずれか1項に記載のヌクレオチドと、6位置換された2-アミノプリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドとが塩基対を形成している、請求項5に記載の核酸。
- 25 7. 前記6位置換された2-アミノプリン-9-イル基が2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン-9-イル基又は2-アミノ-6-(ジメチルアミノ)プリン-9-イル基である、請求項6に記載の核酸。
8. アンチセンスDNA若しくはRNA、リボザイム又はアプタマーとして使用される、請求項5に記載の核酸。

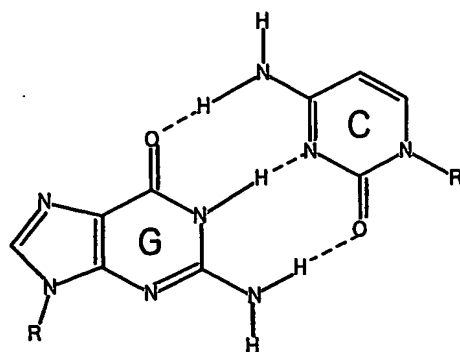
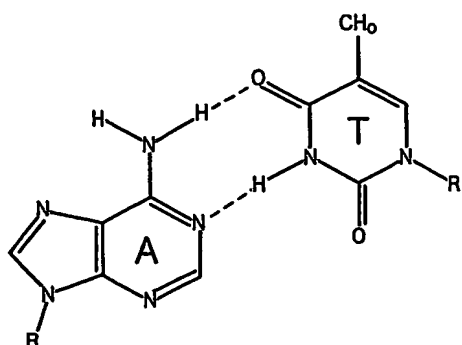
9. タンパク質、ペプチドの全体又は一部をコードする、請求項 5 に記載の核酸。

10. 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のヌクレオチドが組み込まれた、核酸を調製する方法であって、

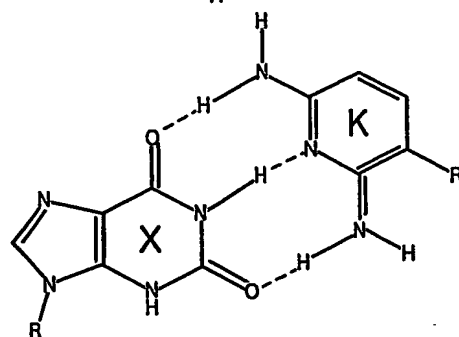
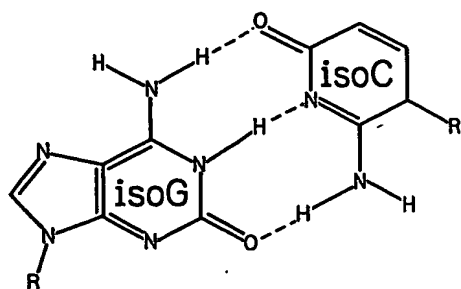
- 5 6 位置換された 2-アミノプリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を鋳型として転写、複製又は逆転写を行い、前記 6 位置換された 2-アミノプリン-9-イル基を塩基として有するヌクレオチドの相補的な位置に、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のヌクレオチドを組み込むことを含む、前記方法。

図 1

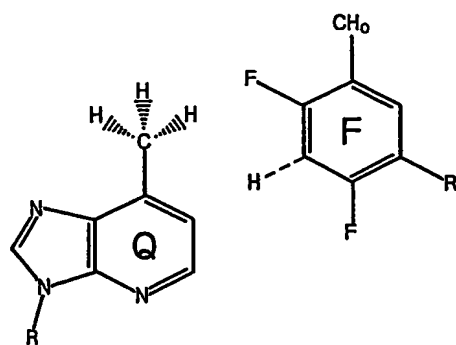
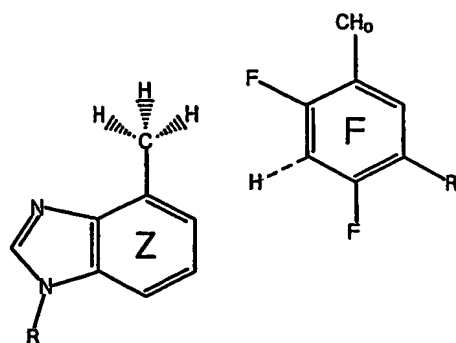
a)



b)



c)



d)

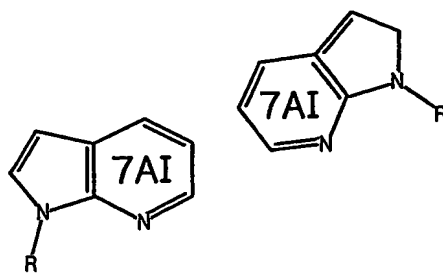
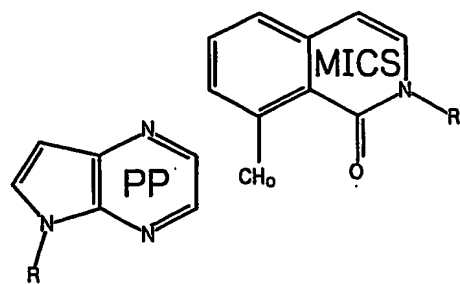
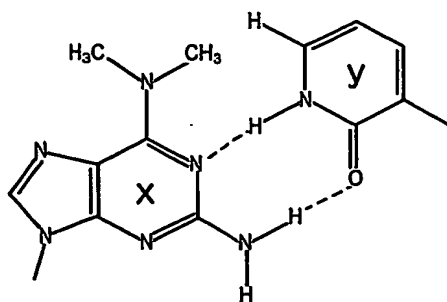
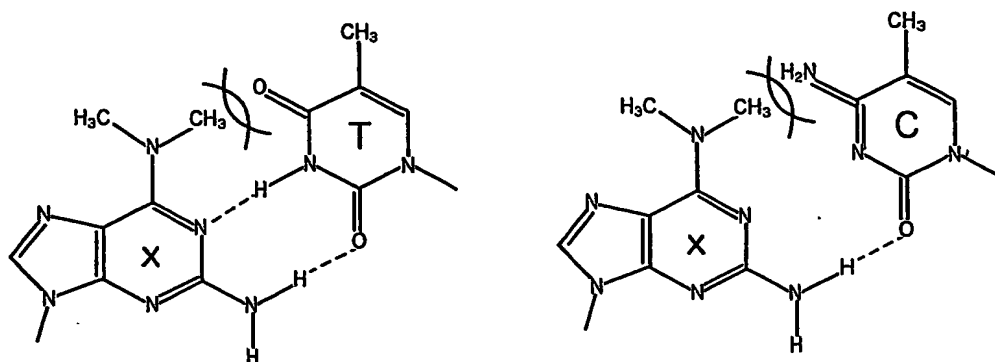


図 2

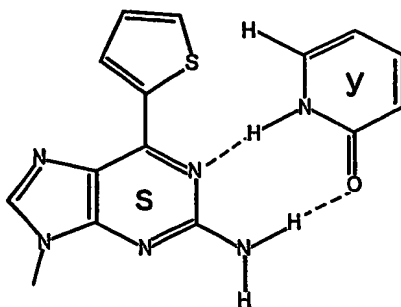
a)



b)



c)



d)

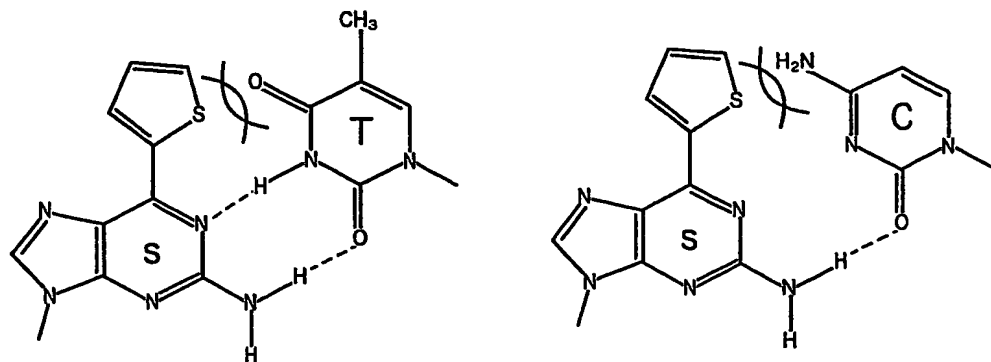
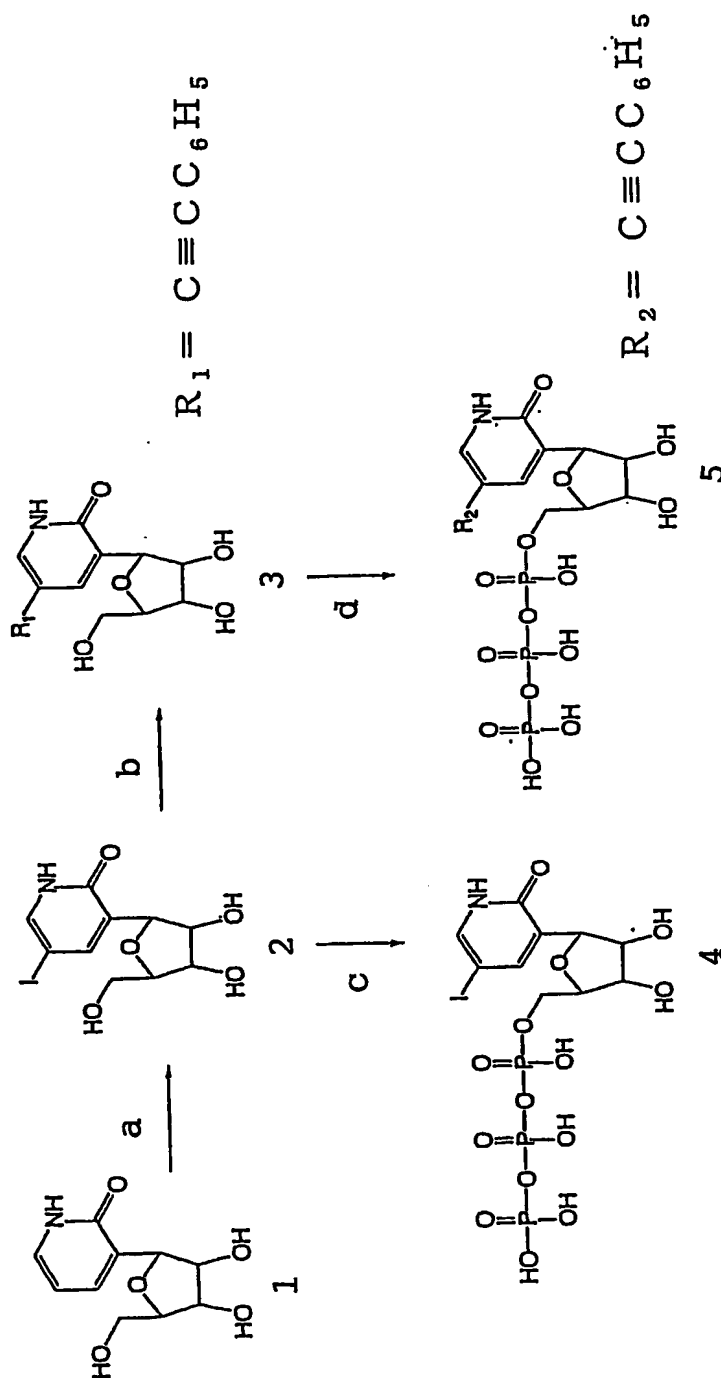
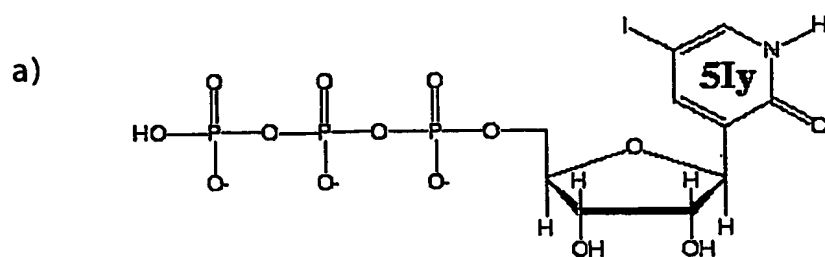


図 3



(a) I_2 , KI, Na_2CO_3 , 100°C , 4h. (b) $\text{CF}_3\text{CONHCH}_2\text{CCH}$, $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, CuI, Et_3N , DMF, rt, 4-6h.
 (c) (1) POCl_3 , $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{PO}$, 0°C , 2h. (2) $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{P}_2\text{O}_7$, 0°C , 10min. (d) (1) POCl_3 , 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene, $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{PO}$, 0°C , 2h. (2) $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{P}_2\text{O}_7$, 0°C , 10min.
 (3) conc. NH_4OH , rt, 10h.

図 4



b)

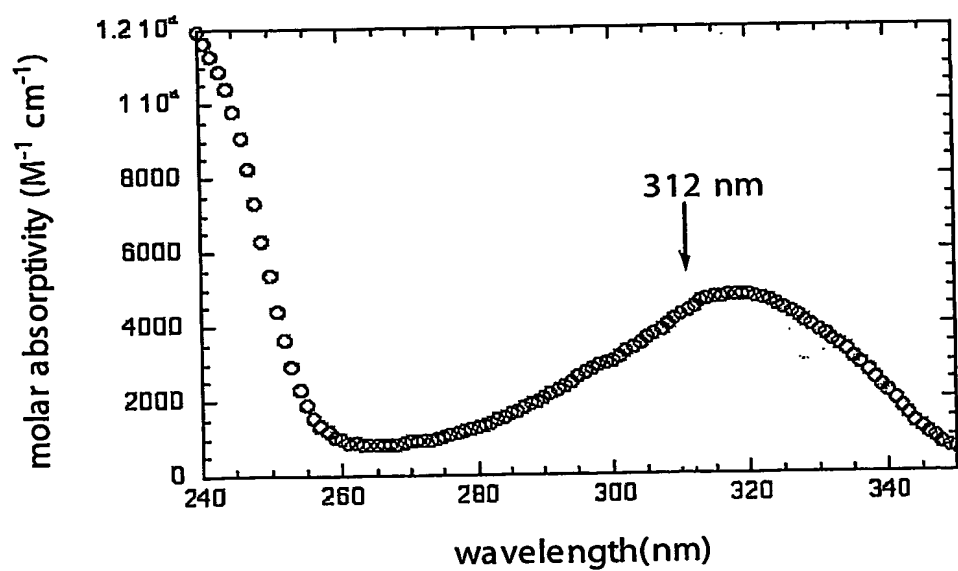


図 5

a)

5'-end primer; 39-mer

39.45 : 5' -GGTAATACGACTCACTATAGGGAGTGGAGGAATTCATCG

3'-end primer; 29-mer

29.45 : 5' -GCAGAAGCTTGCTGTCGCTAAGGCATATG

29.45s84 : 5' -GCAGAAGCTTGCTGTCsCTAAGGCATATG

29.45s87 : 5' -GCAGAAGCTTGCTsTCGCTAAGGCATATG

29.45s92 : 5' -GCAGAAGCsTGCTGTCGCTAAGGCATATG

29.45s84/92 : 5' -GCAGAAGCsTGCTGTCsCTAAGGCATATG

b)

5' - GGGAGUGGAG GAAUUCAUCG AGGCAUAUGU CGACUCCGUC UCCCUUCAA
CCAGUUAUAA AUUGGUUUUA GCAUAUGCCU UAGCGACAGC AAGCUUCUGC

図6

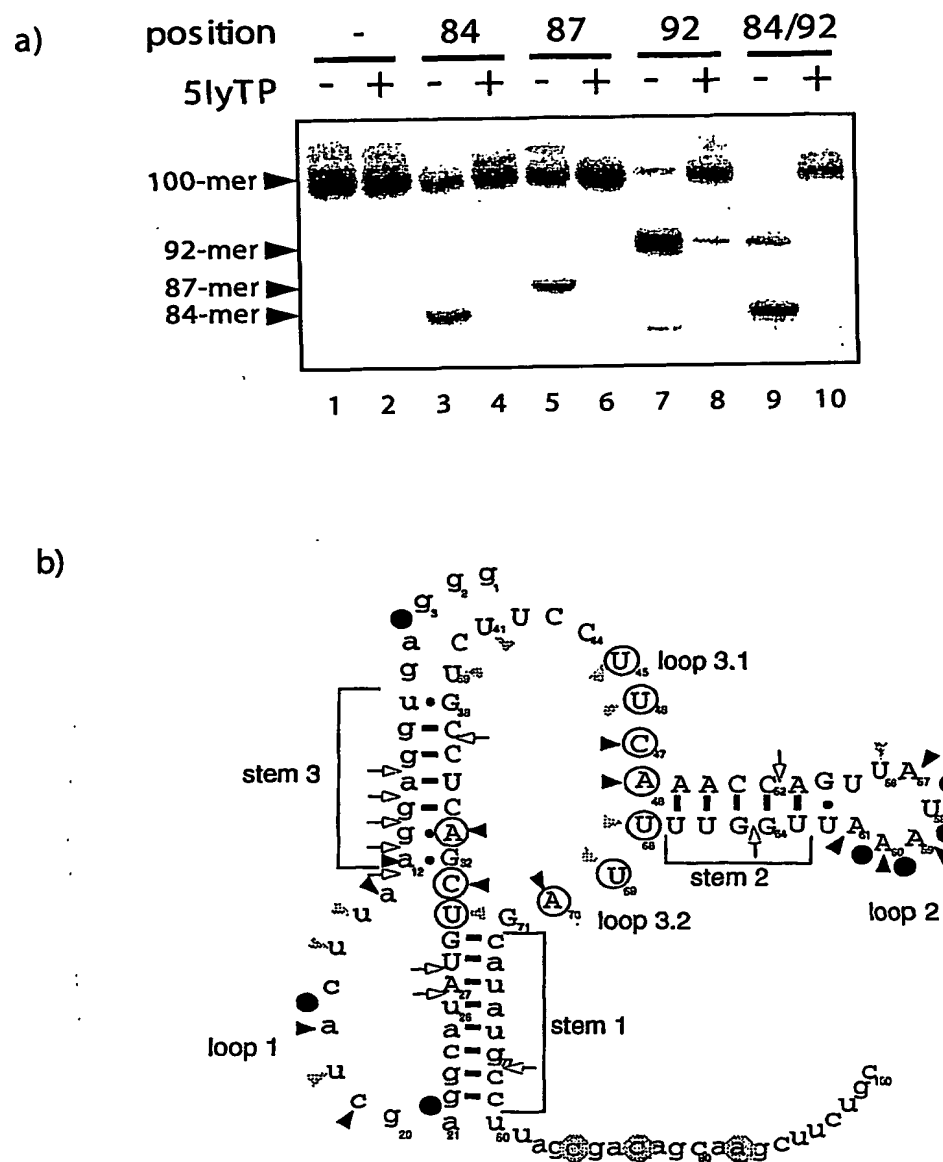


図 7

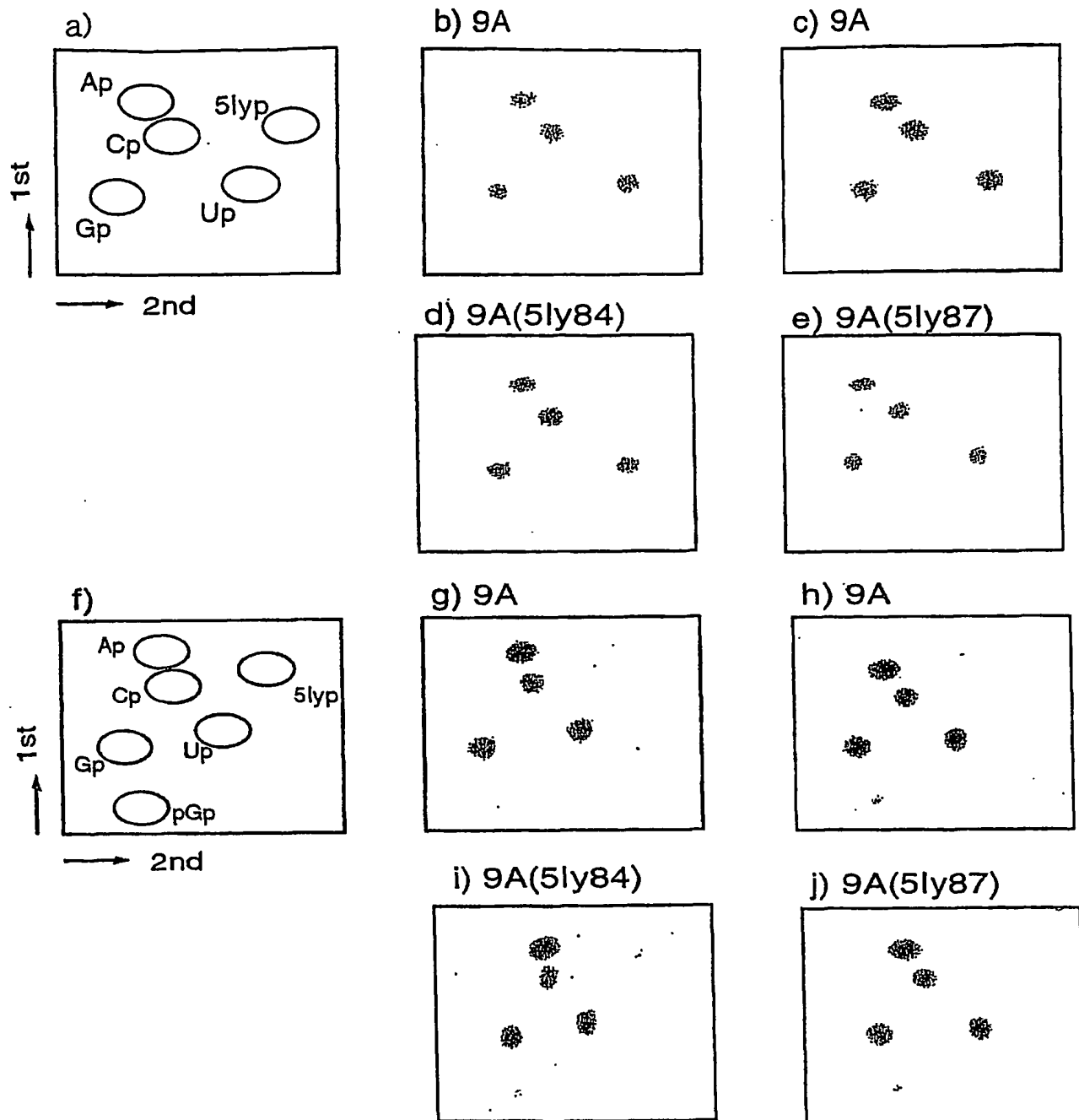


図 8

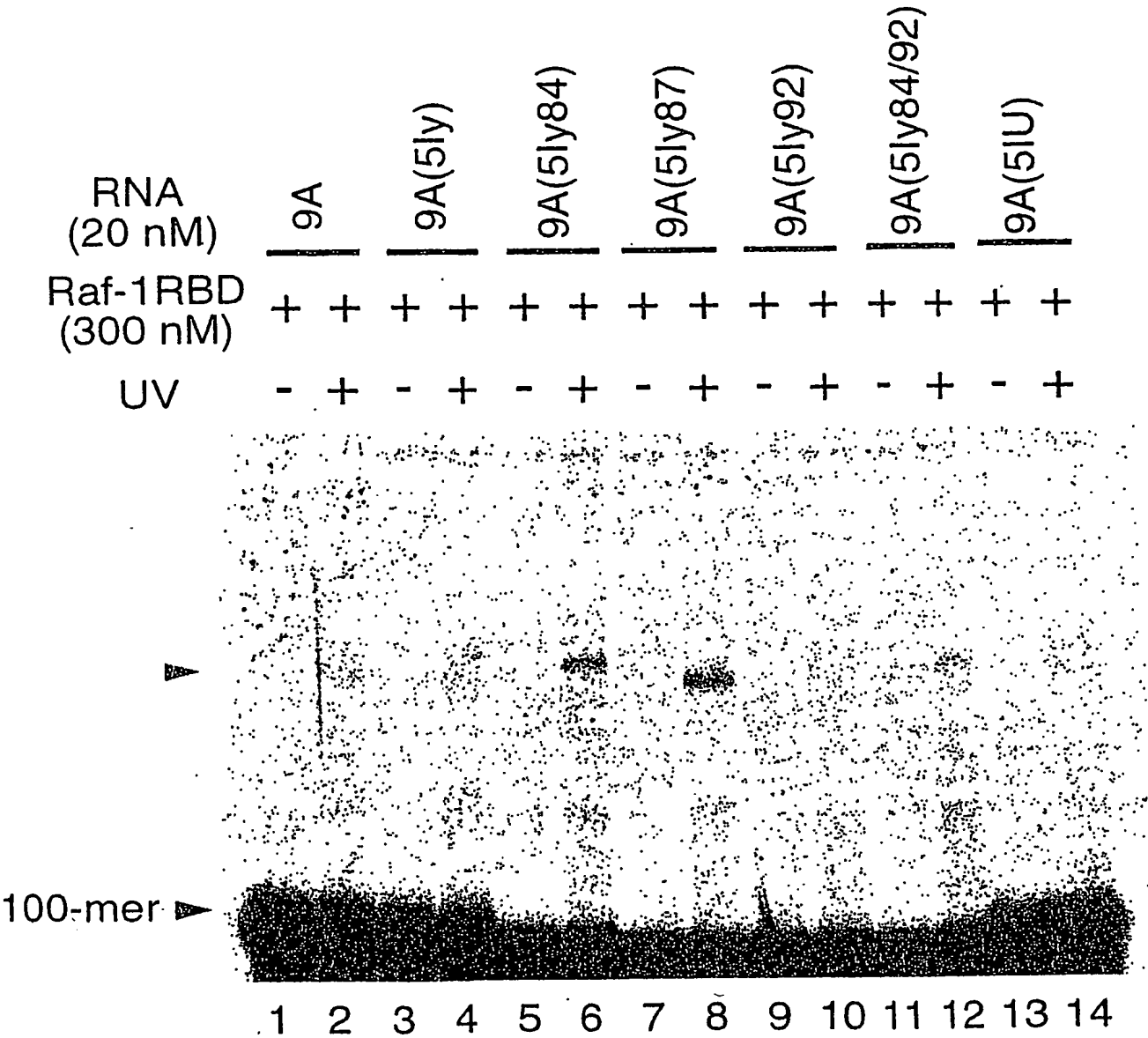


図 9

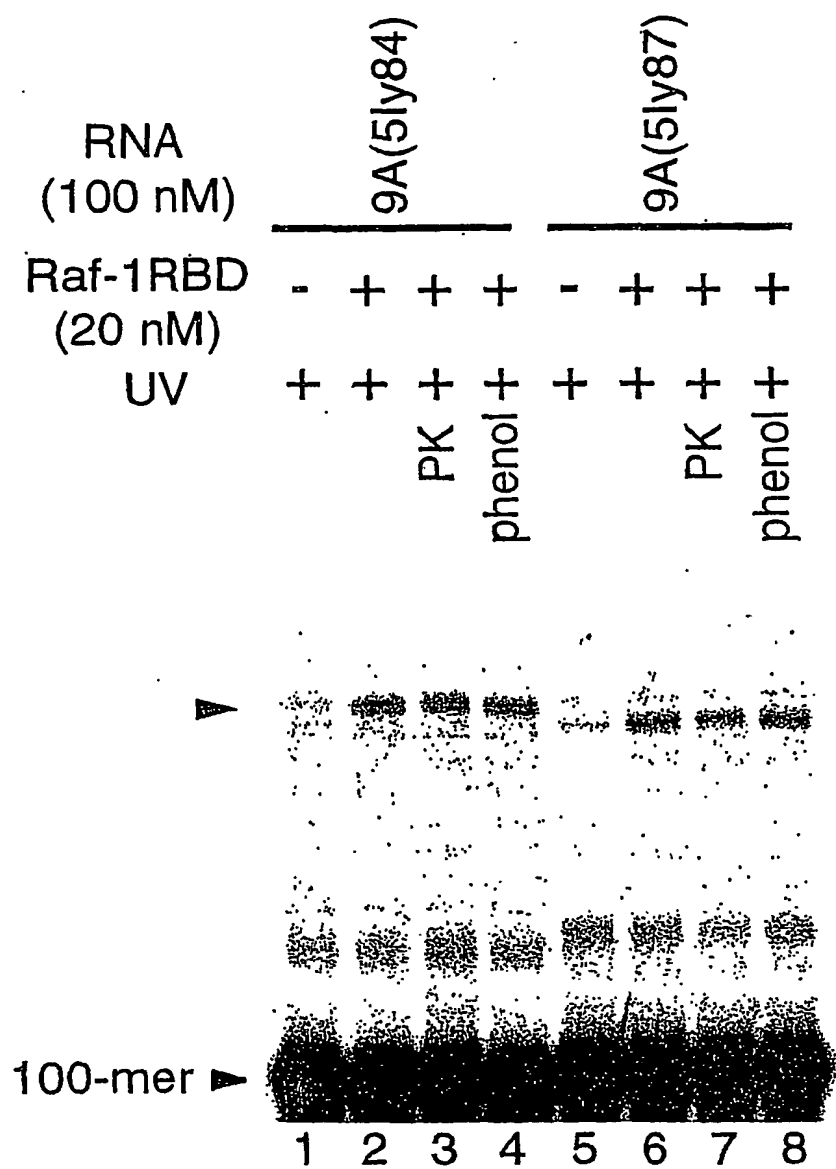
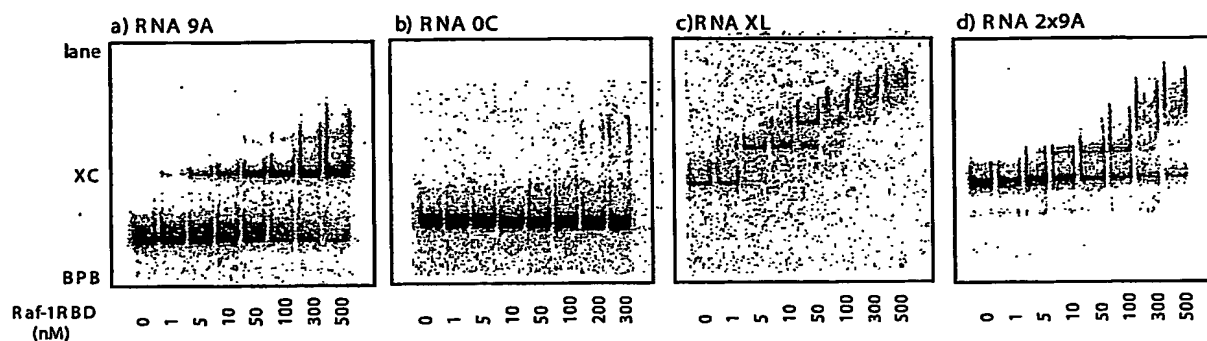


図 10



e) RNA 9A:100-mer

5' - GGGAGUGGAGGAAUUCaucGAGGCAU [-N45-] CAUAUGCCUUAGCGACAGCAAGCUUCUGC - 3'

AUGUCGACUCCGUCUCCUCAAACCAGUUAUAAAUGGUUUUAG

RNA 9A(5ly87):100-mer

5' - GGGAGUGGAGGAAUUCaucGAGGCAU [-N45-] cauaugccuuagcga5IyCAGCAAGCUUCUGC - 3'

RNA 2x9A:200-mer

5' - GGGAGUGGAGGAAUUCaucGAGGCAU [-N45-] CAUAUGCCUUAGCGACAGCAAGCUUCUGC -

- GGGAGUGGAGGAAUUCaucGAGGCAU [-N45-] CAUAUGCCUUAGCGACAGCAAGCUUCUGC - 3'

RNA OC:100-mer

5' - GGGAGUGGAGGAAUUCaucGAGGCAU [-N45-] CAUAUGCCUUAGCGACAGCAAGCUUCUGC - 3'

CUGGGAACCCUAUCUUGCUUUUGGUAGCUGUAUUCACCUGUAAACAG

RNA XL: cross-linking product generated from two molecules of 9A(5ly87)

図 1 1

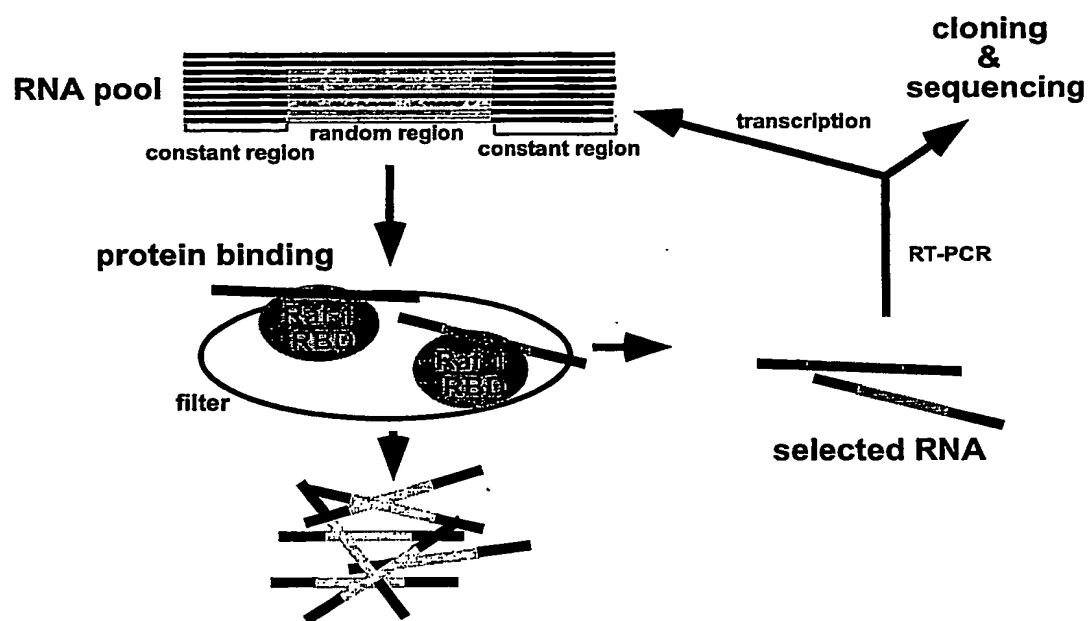


図 1 2

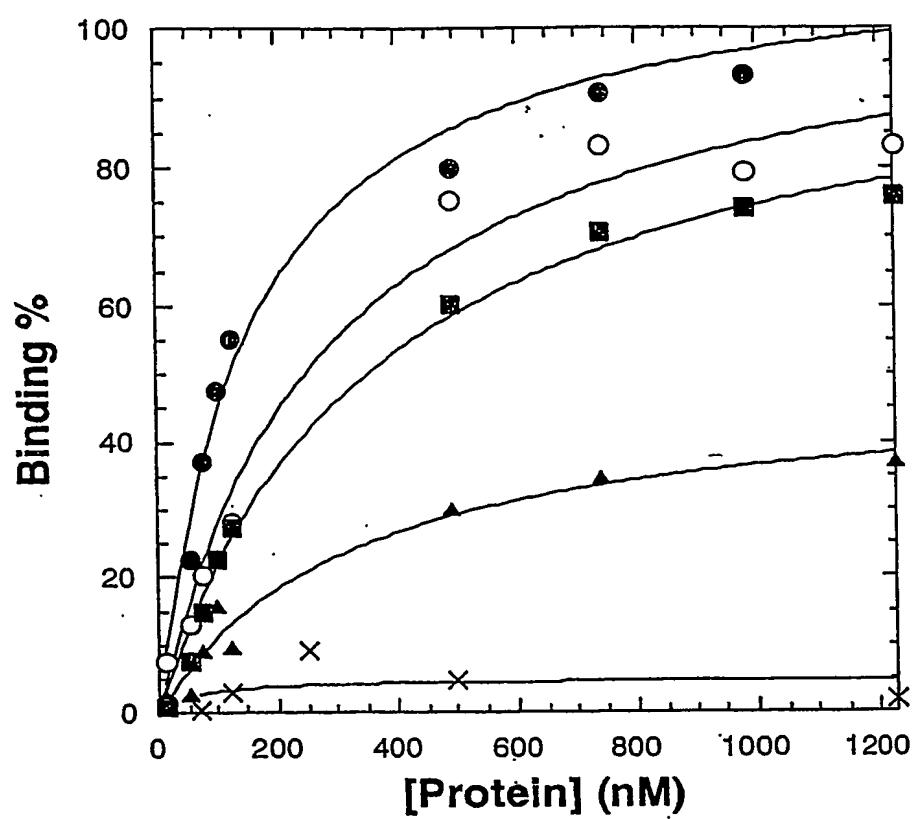


図 13

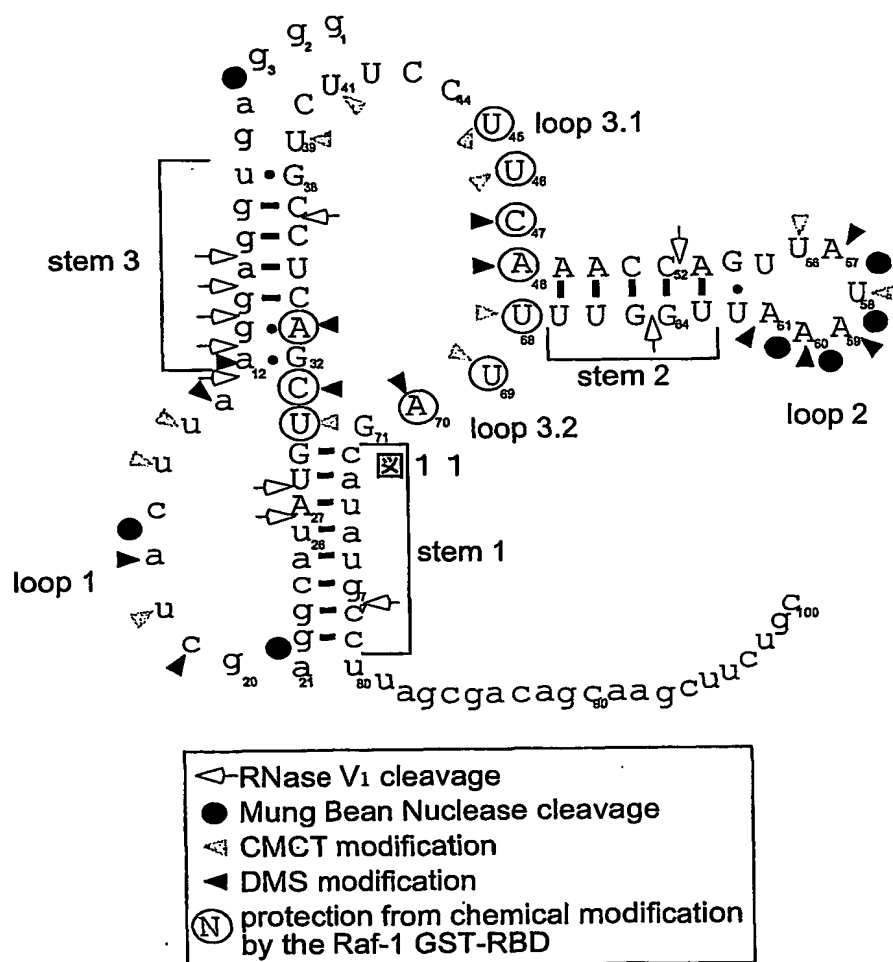
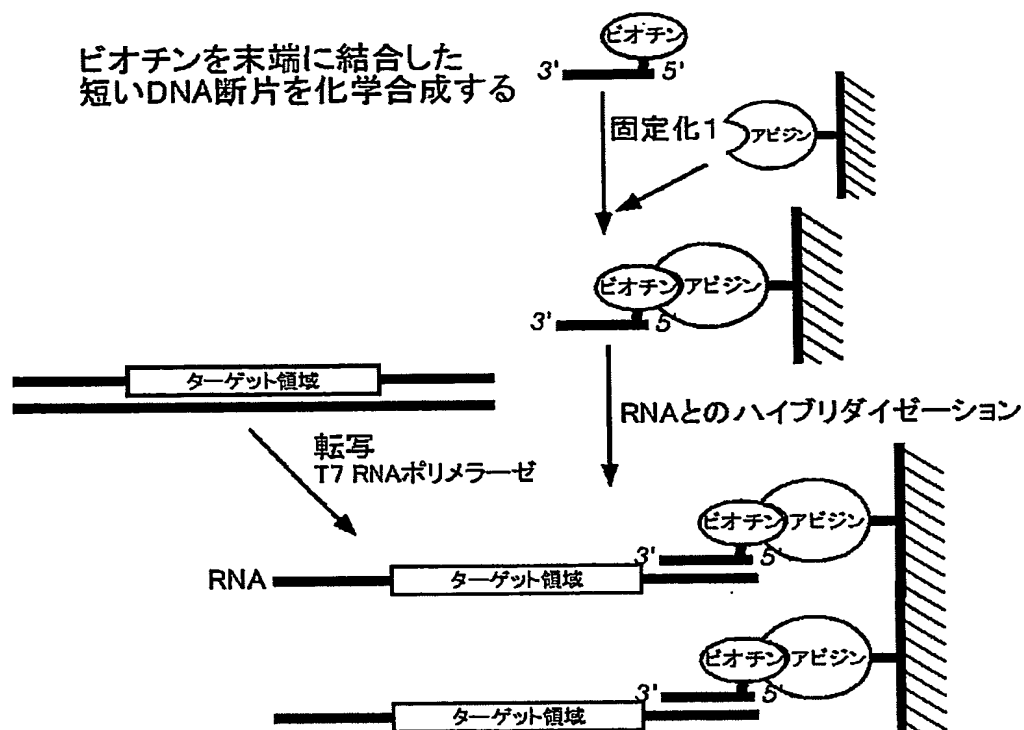


図 1 4

従来法 1



従来法 2

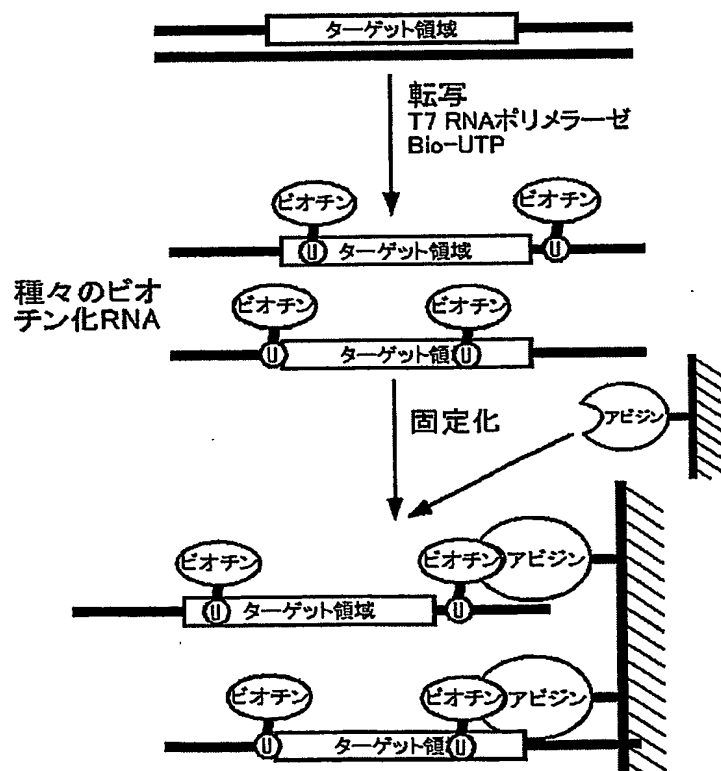
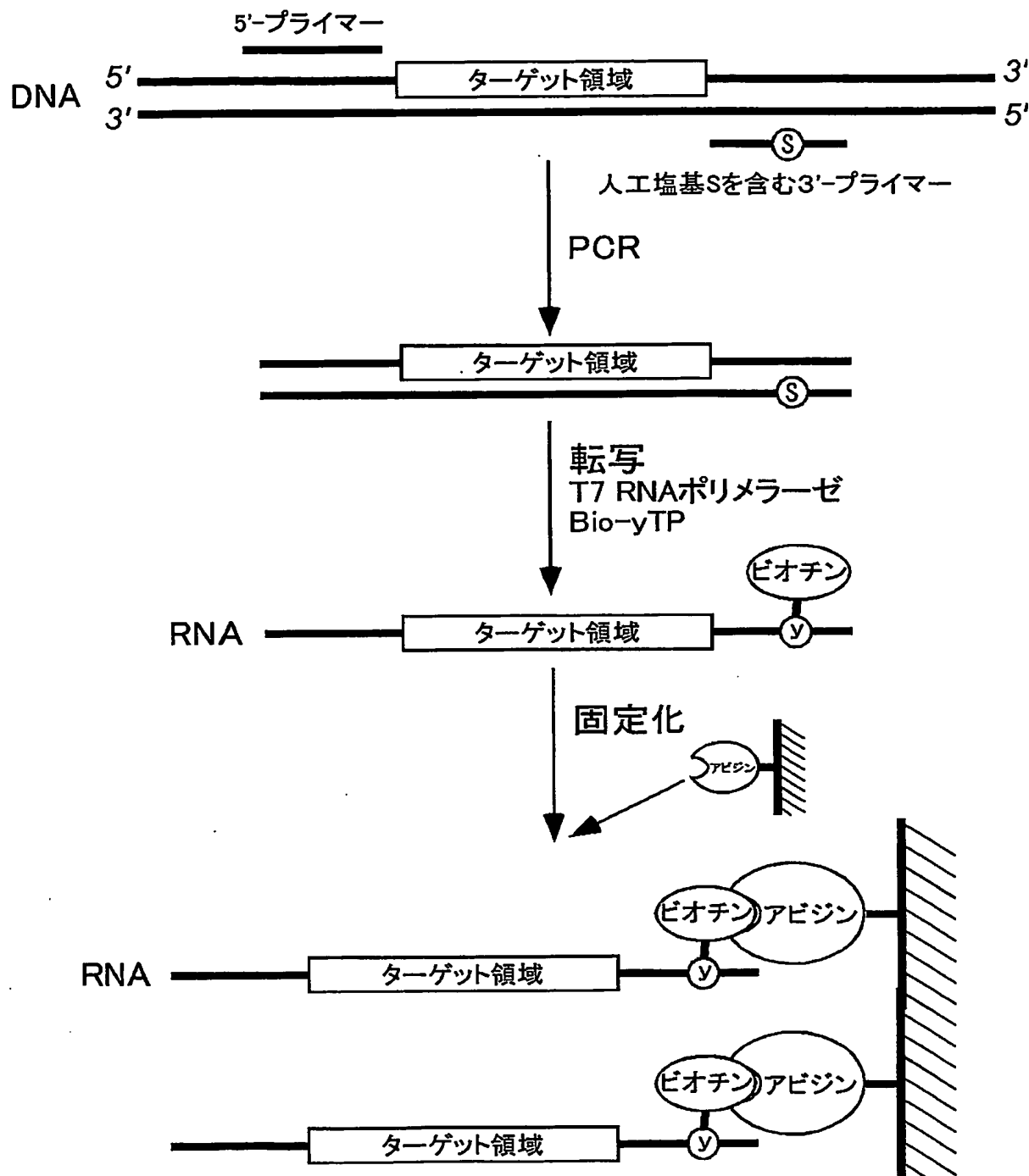
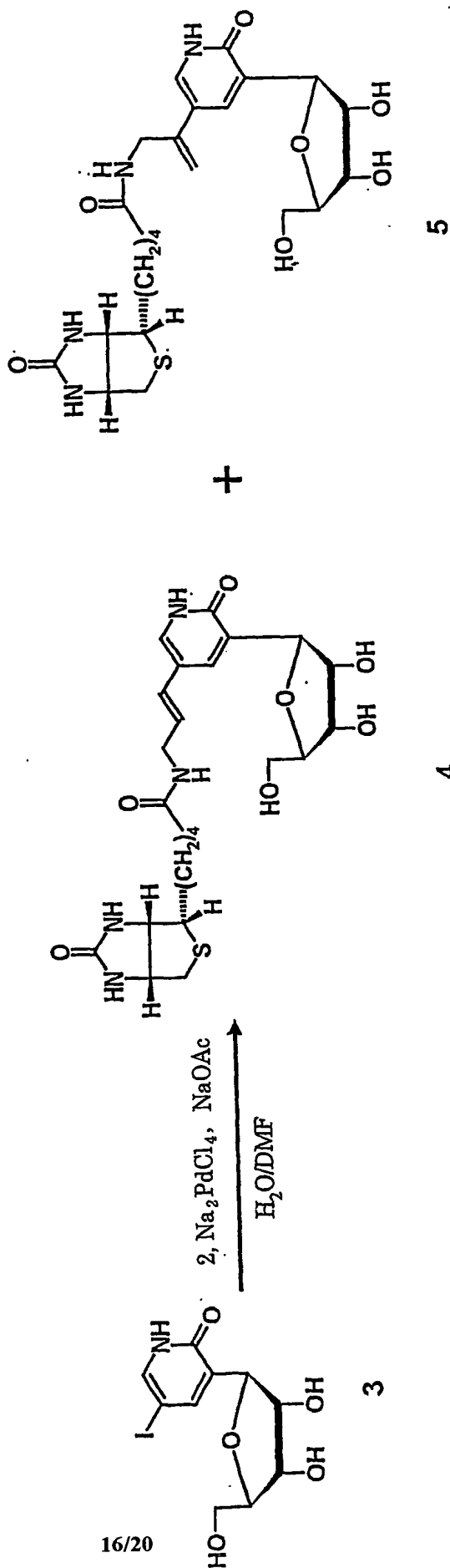
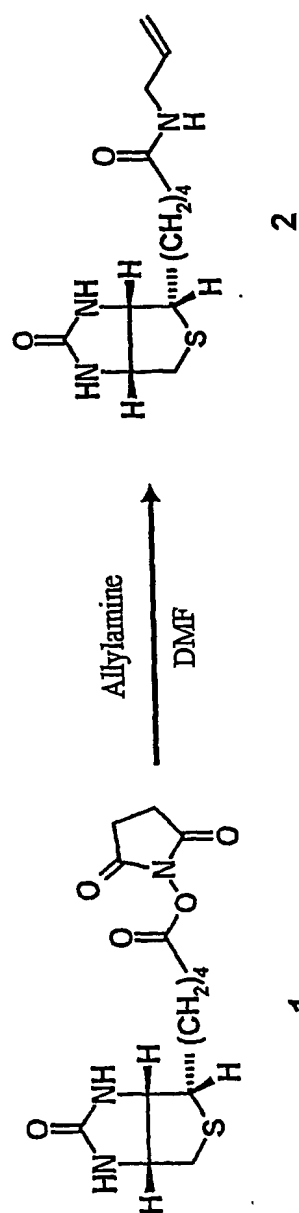


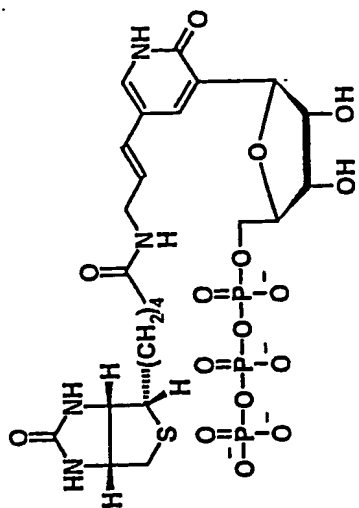
図14 (続き)

人工塩基対を用いた本法

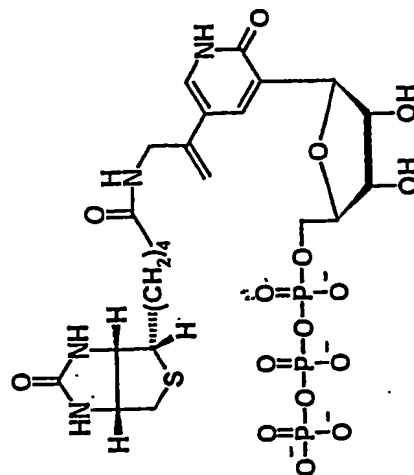




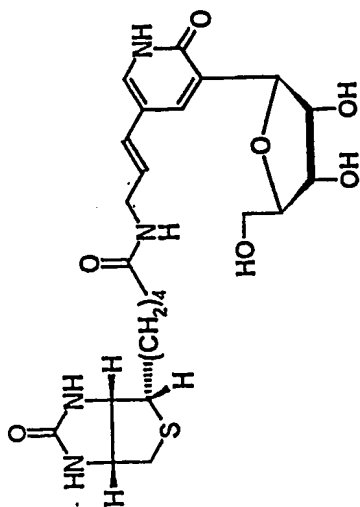
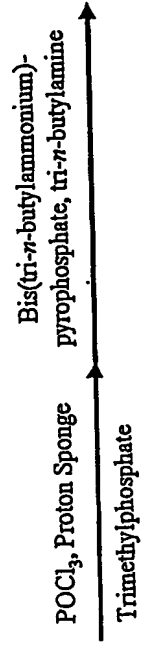
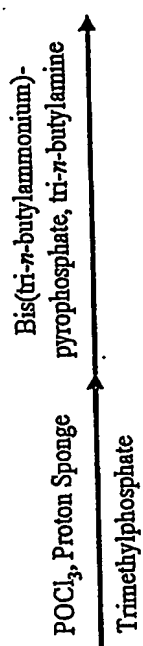
4 : 5 = 0.53 : 0.47



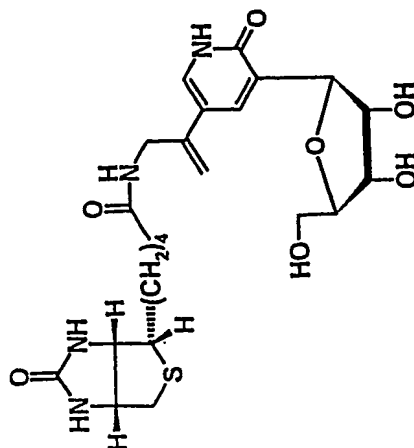
6



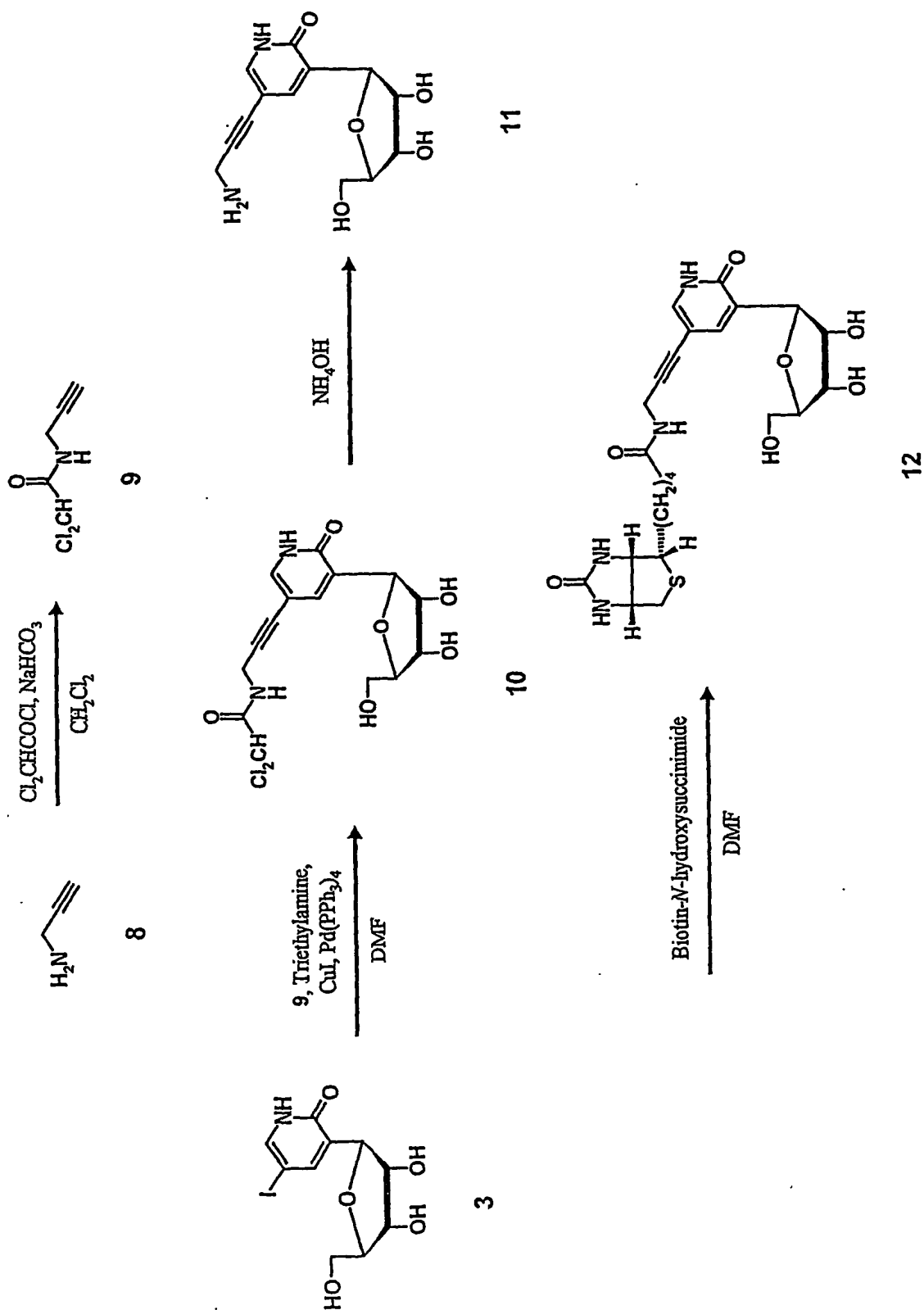
7

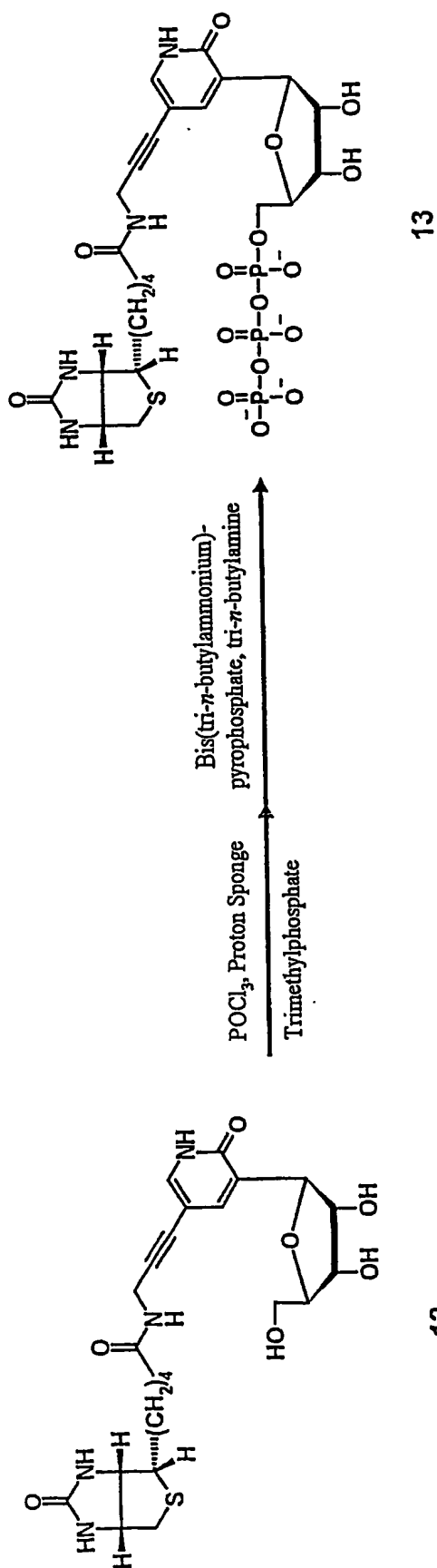


4



5



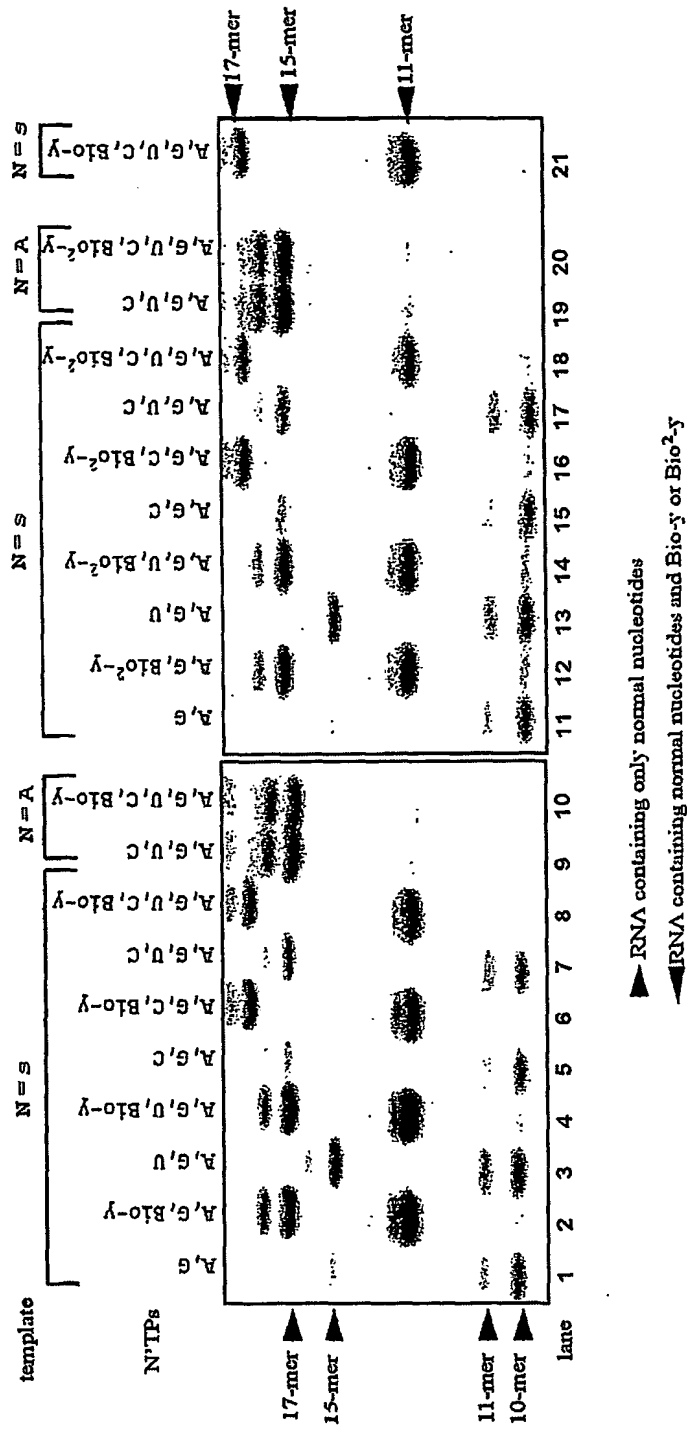


19

non-template strand (T7prim28N): 5' -d (ATAATCGACTCTACTATAGGGAGGAAGA)
template strand (temp35s or temp35A): 3' -d (TATTATGCTGAGTGATATCCCTCTCTNTCTCGT) N = s or A
+1 +11 +13 +17

↓ T7 RNA polymerase
1 mM N'TPs, [α -³²P]ATP, 10 mM GMP

in the absence of CTP: 15-mer RNA r (GGGAGGAAGAN' AGAG)
in the presence of CTP: 17-mer RNA r (GGGAGGAAGAN' AGAGCA)



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

Japan Science and Technology Corporation

<120> Nucleic acid having a novel unnatural base and use thereof

<130> YCY797

<150> JP 2002-208568

<151> 2002-7-17

<160> 10

<210> 1

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> RNA aptamer

<400> 1

gggaguggag gaauucug aggcauangu cgacuccguc ucccucaaa ccaguauaaa 60
auugguuuuu gcauugccu uagcgacagc aagcuucugc 100

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed primer for PCR

<400> 2

ggtaatacga ctactatag ggagtggagg aattcatcg 39

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed primer for PCR

<400> 3

gcagaagctt gctgtcgcta aggcataatg 29

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<221> n means 2-amino-6-(2-thienyl)-purine-9-yl

<223> Designed primer for PCR

<400> 4

gcagaagctt gctgtcncta aggcataatg 29

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<221> n means 2-amino-6-(2-thienyl)-purine-9-yl

<223> Designed primer for PCR

<400> 5

gcagaagctt gctntcgcta aggcataatg

29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<221> n means 2-amino-6-(2-thienyl)-purine-9-yl

<223> Designed primer for PCR

<400> 6

gcagaagcnt gctgtcgcta aggcataatg

29

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<221> n means 2-amino-6-(2-thienyl)-purine-9-yl

<223> Designed primer for PCR

<400> 7

gcagaagcnt gctgtcncta aggcataatg

29

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<221> n means 2-amino-6-(2-thienyl)-purine-9-yl

<223> Synthesized template strand for transcription

<400> 8

tattatgctg agtgatatcc ctccttctnt ctcgt 35

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized template strand for transcription

<400> 9

tattatgctg agtgatatcc ctccttctat ctcgt 35

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed primer for transcription

<400> 10

ataatcgact ctactatagg gaggaaga 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02342

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07H7/06, C07H11/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07H7/06, C07H11/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	Ichiro HIRAO et al., "Jinko Enkitai no Sosei Iden Ango no Kakucho o Mezashite", Protein, Nucleic acid and Enzyme, Vol.47, No.14, pages 1904 to 1913 (November, 2002)	1-10
A	I. HIRAO et al., "A Unique Unnatural Base Pair Between a C Analogue, Pseudoisocytosine, and an A Analogue, 6-Methoxypurine, in Replication", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol.12, pages 1391 to 1393, (May, 2002)	1-10
A	T. FUJIWARA et al., "Synthesis of 6-(2-Thienyl) purine Nucleoside Derivatives That Form Unnatural Base Pairs with Pyridin-2-one Nucleosides", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol.11, pages 2221 to 2223, (2001)	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 02 May, 2003 (02.05.03)

Date of mailing of the international search report
 20 May, 2003 (20.05.03)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02342

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	I. HIRANO et al., "An unnatural base pair for incorporating amino acid analogs into proteins", Nature Biotech., Vol.20, pages 177 to 182, (February, 2002)	1-10
A	WO 01/016149 A (Boehringer Mannheim Gesellschaft Mit Beschränkter Haftung), 08 March, 2001 (08.03.01), & JP 2003-508405 A	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12N 15/09, C07H 7/06, C07H 11/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12N 15/09, C07H 7/06, C07H 11/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	平尾一郎ら, 「人工塩基対の創製 遺伝暗号の拡張を目指して」 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 47, No. 14, P. 1904-1913 (Nov. 2002)	1-10
A	I. Hirao et al, 「A Unique Unnatural Base Pair Between a C Analogue, Pseudoisocytosine, and an A Analogue, 6-Methoxypurine, in Replication」 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 12, P. 1391-1393 (May 2002)	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
0 2 . 0 5 . 0 3

国際調査報告の発送日
20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
新見 浩一

4 B 9 1 6 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	T.Fujiwara et al, 「Synthesis of 6-(2-Thienyl)purine Nucleoside Derivatives That Form Unnatural Base Pairs with Pyridin-2-one Nucliosides」 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 11, P. 2221-2223 (2001)	1-10
A	I Hirao et al, 「An unnatural base pair for incorporating amino acid analogs into proteins」 Nature Biotech., Vol. 20, P. 177-182 (Feb. 2002)	1-10
A	WO 01/016149 A (Boehringer Mannheim Gesellschaft Mit Beschränkter Haftung) 2001.03.08 & JP 2003-508405 A	1-10